

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)


Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts E01/1108/WO	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01540	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 12/05/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 14/05/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK B01J19/00		
Anmelder EPIGENOMICS AG et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  14/12/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  07.08.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Nazario, L  Tel. Nr. +49 89 2399 8137





**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-15                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-19                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/1                        ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01540

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. B gründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	10
	Nein: Ansprüche	1-9, 11-19
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-19
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-19
	Nein: Ansprüche	

### 2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

## VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:  
siehe Beiblatt

## VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
siehe Beiblatt



**Zu Punkt V**

**B gründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Es wird auf das folgende Dokument verwiesen:

D1: US-A-5 510 270

2. D1 offenbart eine Vorrichtung für die Durchführung eines Verfahrens zur Herstellung eines Satzes von Polymeren (z.B. Polynucleotide). Die Vorrichtung umfaßt ein Substrat, ein Mittel zur selektiven Bestrahlung vorbestimmter Bereiche auf der Oberfläche des Substrats (z.B. Lichtleiterfasern) und eine Strahlungsquelle (z.B. Laser oder Glühfadenlampe). D1 offenbart deutlich, dass die Belichtung der Oberfläche des Substrats nicht nur durch gezielte Abdeckung des Substrats, sondern auch durch ein optisches Mittel direkt über der Oberfläche des Substrats erzeugen werden kann. (Zusammenfassung, Spalte 1, Zeile 27-36, Spalte 3, Zeile 25 bis Spalte 4, Zeile 16, Spalte 7, Zeile 18-20, Spalte 8, Zeile 63-64, Spalte 13, Zeile 3 bis Spalte 14, Zeile 26, insbesondere Spalte 14, Zeile 10-25, Spalte 15, Zeile 46 bis Spalte 18, Zeile 21, Spalte 21, Zeile 12-26, Abbildungen 1, 8, 9).

Folglich ist D1 neuheitsschädlich für die Ansprüche 1-9 und 11-19 (Artikel 33(2) PCT).

3. Das zusätzliche Merkmal des Anspruchs 10 ist dem Fachmann allgemein bekannt. Folglich ist der Gegenstand des Anspruchs nicht erfinderisch (Artikel 33(3) PCT).

**Zu Punkt VII**

**Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

1. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in D1 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.





**Zu Punkt VIII**

**B stimmte B merkung n zur internationalen Anmeldung**

1. Die Merkmale in dem Vorrichtungsansprüche 5-7 beziehen sich auf ein Verfahren zur Verwendung der Vorrichtung und nicht auf die Definition der Vorrichtung anhand ihrer technischen Merkmale. Die beabsichtigen Einschränkungen gehen daher im Widerspruch zu den Erfordernissen des Artikels 6 PCT nicht klar aus dem Anspruch hervor.



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 B01J19/00 C07K1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01J C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 510 270 A (FODOR STEPHEN P A ET AL) 23 April 1996 (1996-04-23) column 6, line 59 - line 60 column 7, line 18 - line 20 column 13, line 3 - column 14, line 26 column 15, line 46 - column 18, line 21 figures 1,8A	1-3,5,6, 11-17,19
A	US 5 293 437 A (NIXON MICHAEL A) 8 March 1994 (1994-03-08) column 2, line 43 - column 3, line 11 --- -/--	1-4,16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 September 2000

Date of mailing of the international search report

09/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Krametz, E

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PEASE A C ET AL: "LIGHT-GENERATED OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS FOR RAPID DNA SEQUENCE ANALYSIS"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 91, 1 May 1994 (1994-05-01), pages 5022-5026, XP000196311</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>page 5022, right-hand column, paragraph 4</p> <p>-page 5023, left-hand column, paragraph 1</p> <p>---</p>	1,2,6,7, 13,14, 16,17
A	<p>US 5 571 639 A (HUBBELL EARL A ET AL)</p> <p>5 November 1996 (1996-11-05)</p> <p>column 16, line 52 -column 18, line 12</p> <p>figure 10</p> <p>---</p>	1,16
A	<p>GB 2 270 189 A (THERMOTOR LIMITED)</p> <p>2 March 1994 (1994-03-02)</p> <p>page 1, line 7 - line 19</p> <p>---</p>	11
P,A	<p>DE 198 23 454 A (EPIGENOMICS GMBH)</p> <p>25 November 1999 (1999-11-25)</p> <p>column 2, line 42 -column 4, line 56</p> <p>figure 2</p> <p>-----</p>	1,6-8, 10,11, 13,14, 16,17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01540

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5510270	A	23-04-1996	US 5405783 A	11-04-1995
			US 5143854 A	01-09-1992
			US 5744305 A	28-04-1998
			US 5445934 A	29-08-1995
			AT 110738 T	15-09-1994
			AT 175421 T	15-01-1999
			AU 651795 B	04-08-1994
			AU 5837190 A	07-01-1991
			AU 672723 B	10-10-1996
			AU 7765594 A	04-05-1995
			BR 9007425 A	21-07-1992
			CA 2054706 A	08-12-1990
			DE 69012119 D	06-10-1994
			DE 69012119 T	22-12-1994
			DE 69032888 D	18-02-1999
			DE 69032888 T	29-07-1999
			DK 476014 T	14-11-1994
			EP 0476014 A	25-03-1992
			EP 0619321 A	12-10-1994
			EP 0902034 A	17-03-1999
			EP 0953835 A	03-11-1999
			ES 2058921 T	01-11-1994
			ES 2129101 T	01-06-1999
			GB 2248840 A, B	22-04-1992
			HK 61395 A	05-05-1995
			HK 64195 A	05-05-1995
			HU 59938 A	28-07-1992
			IL 94551 A	30-03-1995
			JP 11315095 A	16-11-1999
			JP 11021293 A	26-01-1999
			JP 4505763 T	08-10-1992
			KR 9701577 B	11-02-1997
			KR 9701578 B	11-02-1997
			WO 9015070 A	13-12-1990
			NL 191992 B	01-08-1996
			NL 9022056 T	02-03-1992
			NO 301233 B	29-09-1997
			NZ 233886 A	25-02-1993
			SG 13595 G	16-06-1995
			US 5744101 A	28-04-1998
			US 5489678 A	06-02-1996
			US 5889165 A	30-03-1999
			US 5753788 A	19-05-1998
			US 5547839 A	20-08-1996
			US 5770456 A	23-06-1998
			US 5800992 A	01-09-1998
			US 5902723 A	11-05-1999
			US 5424186 A	13-06-1995
			US 5871928 A	16-02-1999
US 5293437	A	08-03-1994	NONE	
US 5571639	A	05-11-1996	US 5593839 A	14-01-1997
			US 5856101 A	05-01-1999
GB 2270189	A	02-03-1994	NONE	
DE 19823454	A	25-11-1999	AU 4896899 A	06-12-1999

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19823454 A		W0 9960156 A	25-11-1999

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 B01J19/00 C07K1/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RESEARCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 B01J C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 510 270 A (FODOR STEPHEN P A ET AL) 23. April 1996 (1996-04-23) Spalte 6, Zeile 59 - Zeile 60 Spalte 7, Zeile 18 - Zeile 20 Spalte 13, Zeile 3 - Spalte 14, Zeile 26 Spalte 15, Zeile 46 - Spalte 18, Zeile 21 Abbildungen 1,8A ----	1-3,5,6, 11-17,19
A	US 5 293 437 A (NIXON MICHAEL A) 8. März 1994 (1994-03-08) Spalte 2, Zeile 43 - Spalte 3, Zeile 11 ----- -/--	1-4,16

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. September 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/10/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Krametz, E

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>PEASE A C ET AL: "LIGHT-GENERATED OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS FOR RAPID DNA SEQUENCE ANALYSIS"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 91, 1. Mai 1994 (1994-05-01), Seiten 5022-5026, XP000196311 ISSN: 0027-8424 Seite 5022, rechte Spalte, Absatz 4 -Seite 5023, linke Spalte, Absatz 1</p> <p>---</p>	1,2,6,7, 13,14, 16,17
A	<p>US 5 571 639 A (HUBBELL EARL A ET AL) 5. November 1996 (1996-11-05) Spalte 16, Zeile 52 -Spalte 18, Zeile 12 Abbildung 10</p> <p>---</p>	1,16
A	<p>GB 2 270 189 A (THERMOTOR LIMITED) 2. März 1994 (1994-03-02) Seite 1, Zeile 7 - Zeile 19</p> <p>---</p>	11
P,A	<p>DE 198 23 454 A (EPIGENOMICS GMBH) 25. November 1999 (1999-11-25)</p> <p>Spalte 2, Zeile 42 -Spalte 4, Zeile 56 Abbildung 2</p> <p>-----</p>	1,6-8, 10,11, 13,14, 16,17



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 14 February 2001 (14.02.01)	
<b>International application No.</b> PCT/DE00/01540	<b>Applicant's or agent's file reference</b> E01/1108/WO
<b>International filing date (day/month/year)</b> 12 May 2000 (12.05.00)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 14 May 1999 (14.05.99)
<b>Applicant</b> BRAUN, Aron et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
14 December 2000 (14.12.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer R. Forax</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--



## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference E01/1108/WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/01540	International filing date (day/month/year) 12 May 2000 (12.05.00)	Priority date (day/month/year) 14 May 1999 (14.05.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC B01J 19/00		
Applicant EPIGENOMICS AG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 14 December 2000 (14.12.00)	Date of completion of this report 07 August 2001 (07.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

PCT/DE00/01540

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
 pages \_\_\_\_\_ 1-15 \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_ 1-19 \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_ 1/1 \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	10	YES
	Claims	1-9, 11-19	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. This report makes reference to the following document:

D1: US-A-5 510 270.

2. D1 discloses a device for carrying out a process for producing a set of polymers (e.g. polynucleotides). The device comprises a substrate, means for selectively irradiating predetermined areas of the substrate surface (e.g. optical fibres) and a radiation source (e.g. laser or incandescent filament lamp). D1 clearly discloses that exposure of the substrate surface can be produced not only by selectively covering the substrate, but also by optical means located directly over the substrate surface (see the abstract; column 1, lines 27-36; column 3, line 25 - column 4, line 16; column 7, lines 18-20; column 8, lines 63-64; column 13, line 3 - column 14, line 26; in particular column 14, lines 10-25; column 15, line 46 - column 18, line 21; column 21, lines 12-26; and Figures 1, 8 and 9).

Consequently, D1 is detrimental to the novelty of Claims 1-9 and 11-19 (PCT Article 33(2)).





3. The additional feature of Claim 10 is generally known to a person skilled in the art. Consequently, the claimed subject matter is not inventive (PCT Article 33(3)).



**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite document D1 or indicate the relevant prior art disclosed therein.



**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The features in the device Claims 5-7 concern a method for using the device and not the definition of the device on the basis of its technical features. The intended restriction are therefore not clear from the claim, thereby contravening PCT Article 6.



# PCT

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>E01/1108/WO</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE 00/01540</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>12/05/2000</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>14/05/1999</b>
Anmelder <b>EPIGENOMICS GMBH</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

### 1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbaren **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2.



**Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3.



**Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

### 4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

### 5. Hinsichtlich der Zusammenfassung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

### 6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr.

1



wie vom Anmelder vorgeschlagen



keine der Abb.



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.





Feld III

WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)

Die Zusammenfassung wird wie folgt geändert :

Zeile 3 : nach "Lichtquelle" ist "(A)" einzufügen ;

Zeile 4 : nach "Lichtleiterbündel" ist "(F)" einzufügen,  
und nach "Steuerungseinheit" ist "(B)" einzufügen.



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

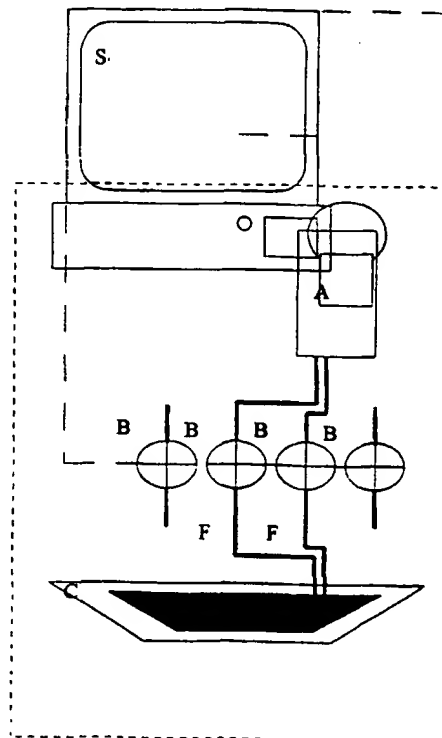
<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>B01J 19/00, C07K 1/04</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/69553</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 23. November 2000 (23.11.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE00/01540 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 12. Mai 2000 (12.05.00) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 199 22 941.4 ✓ 14. Mai 1999 (14.05.99) DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> EPIGENOMICS GMBH [DE/DE]; Kastanienallee 24, D-10435 Berlin (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> BRAUN, Aron [CH/DE]; Christinenstrasse 24, D-10119 Berlin (DE). HEUERMANN, Arno [DE/DE]; Steegerstrasse 70, D-13359 Berlin (DE). <b>(74) Anwalt:</b> SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9, D-10119 Berlin (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>

**(54) Title:** DEVICE AND METHOD FOR PHOTOLITHOGRAPHICALLY IRRADIATING BIOLOGICAL SUBSTANCES**(54) Bezeichnung:** VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR PHOTOLITHOGRAPHISCHEN BELICHTUNG VON BIOLOGISCHEN STOFFEN**(57) Abstract**

The invention relates to a device and method for photolithographically irradiating biological substances. Said device comprises at least one light source (A), a bundle of optical waveguides (F) and a control unit (B), whereby each optical waveguide can be independently controlled using light and/or light can be injected into each optical waveguide. The device is suited, in particular, for exposing DNA chips, PNA chips or peptide chips to light.

**(57) Zusammenfassung**

Es wird eine Vorrichtung und ein Verfahren zur photolithographischen Belichtung von biologischen Stoffen beschrieben, umfassend mindestens eine Lichtquelle (A), ein Lichtleiterbündel (F) und eine Steuerungseinheit (B), wobei jeder der Lichtleiter unabhängig voneinander mit Licht ansteuerbar und/oder Licht in diesen einkoppelbar ist. Die Vorrichtung ist insbesondere zur Belichtung von DNA-, PNA- oder Peptid-Chips geeignet.



### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Vorrichtung und Verfahren zur photolithographischen Belichtung von biologischen Stoffen

5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur photolithographischen Belichtung von biologischen Stoffen.

10 DNA-Chips sind kleinste, meist planare Oberflächen, auf welchen räumlich geordnet eine große Anzahl verschiedener Oligomere (kurze, einsträngige DNA-Moleküle) angebracht sind. Solche Chips werden beispielsweise zur parallelen Erkennung zahlreicher DNA-Sequenzen in einer präparierten Gewebeprobe verwendet. Dazu benetzt man die Chipoberfläche mit einer Lösung von einsträngigen DNA-Stücken aus 15 der Gewebeprobe, worauf sich komplementär passende DNA-Stücke aus der Lösung an die entsprechenden, an die Chipoberfläche angebrachten Oligomere anlagern (Hybridisierung). Danach bestimmt man mit einer geeigneten Methode wie z.B. Fluoreszenzmarkierung, an welchen Stellen auf 20 dem Chip eine Hybridisierung stattgefunden hat. Wenn man weiss, wo auf dem Chip welche Oligomere angebracht sind, kann man somit Rückschlüsse auf DNA-Sequenzen in der Gewebeprobe machen. Dazu definiert man in der Regel auf der 25 Chip-Trägerfläche ein dichtes rechtwinkliges Raster. Auf jedem Rasterpunkt ist in Form eines kleinen Flecks genau eine Sorte von Oligomer angebracht. Die maximal mögliche Anzahl von verschiedenen DNA-Sequenzen auf dem Chip ist demzufolge gleich der Anzahl der Rasterpunkte. Da man 30 möglichst viele Sorten von Oligomeren auf einen Chip aufbringen will, die Chips aber gleichzeitig so klein wie möglich sein sollten, um effektiv hybridisiert werden zu können, ist es ein wichtiges Ziel bei der Herstellung von DNA-Chips, eine möglichst hohe Rasterdichte zu erreichen.

Im Stand der Technik sind verschiedene Verfahren zur DNA-Chip Herstellung bekannt.

- 1) Alle Oligomere werden auf herkömmliche Weise einzeln  
5 im Reagenzglas synthetisiert und danach an den vorgesehenen Rasterpunkten auf den Träger aufpipettiert, typischerweise von einer automatischen Micropipettieranlage. Diese Methode ist sehr aufwendig und teuer, da jedes Oligomer einzeln hergestellt bzw. gekauft und von Hand der  
10 Pipettieranlage zugeführt werden muss. Die Rasterdichte ist durch die hohe Winkelungenauigkeit der heute verfügbaren, typischerweise piezoelektrischen Mikropipetten stark limitiert.
- 2) Die Oligomere werden mit Hilfe einer automatischen Mikropipettieranlage direkt auf dem Chip synthetisiert. Auf  
15 jedem Rasterpunkt wird die dort vorgesehene Oligomerkette Baustein für Baustein (Nukleobasen) aufgebaut. Das chemische Verfahren ist grundsätzlich das selbe wie bei der  
20 herkömmlichen Oligomer-Synthese im Reagenzglas. Der Unterschied ist, dass alle Oligomere gleichzeitig, von einer einzigen automatischen Anlage direkt am vorgesehenen Bestimmungsort hergestellt werden. Die bei Methode 1) separaten Arbeitsschritte Oligomer-Synthese und Micropipettierung werden somit zu einem einheitlichen Arbeitsschritt zusammengefasst. Diese in situ Synthese läuft  
25 normalerweise wie folgt ab: Auf einem vorpräparierten Substrat tropft der Pipettierautomat sequentiell auf jedem Rasterpunkt die dort vorgesehene erste Nukleobase  
30 auf. Dies ist mechanisch nicht sehr aufwendig, da es nur 4 verschiedene Nukleobasen (C, T, G, A) gibt. Man kann dafür z.B. 4 aneinandergekoppelte Micropipetten verwenden. Nach dem Auftragen des ersten Nukleosidbausteins auf  
jedem Rasterpunkt wird das Substrat gewaschen und nach  
35 einem "Capping Schritt" die Schutzgruppen an den 5'-OH Funktionen entfernt, um die Reaktion mit dem jeweils

nachfolgenden Nukleosidbaustein zu ermöglichen. Danach wird an jedem Rasterpunkt die zweite Nukleobase aufpipettiert. Das Substrat wird dann wieder gewaschen und geschützt. Auf diese Weise baut man Schritt für Schritt auf jedem Rasterpunkt die jeweils erforderlichen Oligomerketten auf. Diese Methode ist nicht besonders schnell, da nacheinander auf jedem Rasterpunkt für jede Nukleobase neu pipettiert werden muss. Wie bei Methode 1) ist die Rasterdichte durch die Ungenauigkeit der Micropipetten beschränkt. Die Ungenauigkeit wirkt sich hier noch schlimmer aus, da jeder Rasterpunkt mehrmals nacheinander auf möglichst identische Weise getroffen werden muss.

3) Die Oligomere werden wie bei 2) direkt auf dem Träger synthetisiert, die gezielte Anbindung der richtigen Nukleobasen an den richtigen Rasterpunkten geschieht jedoch durch eine vollkommen parallele, photolithographische Technik anstelle von sequenziellen, zielgenauen Pipettierschritten. Das Verfahren basiert darauf, dass man mit Licht einer bestimmten Wellenlänge gezielt die 5'-OH Schutzgruppen von Oligonukleotiden entfernen kann. Durch geeignete örtliche Bestrahlungsmuster kann man somit Oligonukleotid-Enden an genau jenen Rasterpunkten reaktionsfähig machen, an denen man im nächsten Schritt eine neues Nukleosid anbringen will. Bei vollständiger Benetzung der Chipoberfläche mit einer Nukleotidbaustein-Lösung wird somit nur an den vorher belichteten Stellen ein Nukleotidbaustein angebunden, alle unbelichteten Stellen bleiben unverändert. Die örtlichen Belichtungsmuster werden erzeugt, indem man eine microphotographische schwarzweiss Maske zwischen dem Substrat und der Lichtquelle positioniert, die alle Rasterstellen abdeckt, die nicht reaktionsfähig gemacht werden sollen. Die Verlängerung der Oligomer-Ketten auf allen Rasterpunkten um eine Nukleobase geschieht demnach wie folgt: Mit Hilfe einer ersten Maske werden genau jene Rasterpunkte belichtet, welche um

die erste der 4 möglichen Sorten von Nukleobasen (z.B. C) erweitert werden müssen. Danach wird der Chip mit einer Lösung des entsprechenden Nukleotidbausteins benetzt, worauf nur die belichteten Punkte um diese Base verlängert werden. Da die neu angebundenen Basen noch alle über eine Schutzgruppe verfügen, werden sie in den folgenden Schritten nicht weiter reagieren, bis ihre Schutzgruppen durch eine weitere Belichtung abgespaltet werden. Nach diesem Reaktionsschritt wird der Chip gewaschen. Nun werden mit Hilfe einer zweiten Maske genau jene Rasterstellen belichtet, welche um die zweite der 4 möglichen Sorten von Nukleobasen (z.B. T) erweitert werden müssen. Darauf wird der Chip wiederum mit einer Lösung des entsprechenden Nukleotidbausteins benetzt und die belichteten Stellen dadurch um diese Base verlängert. Genauso verfährt man für die verbleibenden zwei Basen (z.B. G und A). Für die Verlängerung aller Oligomere um eine Nukleobase benötigt man demzufolge vier Belichtungsschritte bzw. 4 Photomasken. Diese Methode ist wegen der hohen Parallelität sehr effizient, zudem ist sie wegen der hohen Präzision, die mit Photolithographie erreicht werden kann, geeignet, um sehr hohe Rasterdichten zu erzielen. Allerdings ist die Methode sehr aufwendig und somit teuer, da man für die Herstellung einer bestimmten Sorte von Chip zuerst eine grosse Anzahl von Photomasken erzeugen muss. Bei hohen Rasterdichten werden zudem hohe Anforderungen an die Positionierungsgenauigkeit der Masken während der Belichtung gestellt, die effizient nur durch Verwendung von teuren Apparaturen erfüllt werden können.

30

4) Es wird dasselbe Verfahren angewandt wie bei 3), nur verwendet man anstelle der grossen Zahl von photographischen Masken eine einzige, transmissive Flüssigkristallanzeige, die elektronisch angesteuert wird und als dynamische Maske dient. Diese Methode ist einfach und billig, da keine photographischen Masken erzeugt werden müssen

35



und das Positionierungsproblem entfällt. Ein mögliches Problem dieser Methode ist der limitierte optische Kontrast der heute verfügbaren Flüssigkristallanzeigen (maximal 1:100). Das Lichtintensitätsverhältnis zwischen belichteten und abgedeckten Punkten wird dadurch reduziert, was eine Ausbeuteverminderung bei der Oligomersynthese zur Folge haben kann.

Diese Methoden nach dem Stand der Technik weisen eine Reihe von Nachteilen auf. Unter den oben beschriebenen Herstellungsmethoden für DNA-Chips ist die photolithographische Methode mit dynamischen Flüssigkristall-Masken die einzige, die eine einfache, billige und zuverlässige Herstellung von Chips mit hoher Rasterdichte erlaubt. Der mangelhafte Kontrast der Flüssigkristallanzeigen hat jedoch eine Verminderung der Qualität der Oligomerpunkte zur Folge, was letztendlich die Detektionsempfindlichkeit des Chips vermindert.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine Vorrichtung zu schaffen, welche die Nachteile des Standes der Technik überwindet. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Schaffung eines weiteren Verfahrens zur photolithographischen Belichtung biologischer Stoffe.

Die Aufgabe wird durch die kennzeichneten Merkmale des Hauptanspruchs gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind in den abhängigen Unteransprüchen gekennzeichnet.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß eine Vorrichtung zur photolithographischen Belichtung von biologischen Stoffen geschaffen wird, umfassend mindestens eine Lichtquelle, ein Lichtleiterbündel und eine Steuerungseinheit, wobei jeder der Lichtleiter unabhängig von-

einander mit Licht ansteuerbar und/oder Licht in diesen einkoppelbar ist.

5 Bevorzugt ist es dabei, daß die Lichtquelle monochromatisches oder kontinuierliches Licht in einem Wellenlängenbereich von 100 bis 800 nm aussendet. Besonders bevorzugt ist es, daß die Lichtquelle ein Laser, eine Leuchtdiode, eine Metalldampf Lampe, eine Gasentladungslampe, eine Gasanregungslampe, eine Glühfadenlampe oder eine Lichtbogenlampe ist.

10 Weiterhin vorteilhaft ist es, daß zur Ansteuerung der einzelnen Lichtleiter Leuchtdioden und/oder optische Schalter angeordnet sind.

15 Besonders vorteilhaft ist es ferner, daß zu belichtende Stoffe direkt an den Enden der Lichtleiter aufgebracht sind. Bevorzugt ist es aber auch, daß zu belichtende Stoffe auf einem separaten Träger angeordnet sind.

20 Ganz besonders bevorzugt ist es, daß zu belichtende Stoffe auf einem separaten Träger angeordnet sind, wobei dieser Träger ein DNA-Chip, ein PNA-Chip oder ein Peptid-Chip ist.

25 Erfindungsgemäß weist die Vorrichtung vorzugsweise zusätzlich mindestens einen Detektor auf.

30 Bevorzugt ist dabei, daß mindestens einer der Detektoren derart angeordnet ist, daß dieser das zur Belichtung verwendete Licht erfaßt und/oder mindestens ein Detektor derart angeordnet ist, daß dieser das von den belichteten Stoffen reflektierte und/oder durch Fluoreszenz erzeugte Licht erfaßt und daß zur Lichtführung für die Detektoren  
35 gegebenenfalls Lichtleiter und/oder Lichtleiterbündel

vorgesehen sind. Insbesondere bevorzugt ist hierbei, daß die Detektoren CCD-Detektoren und/oder CCD-Kamera sind.

5 Ganz besonders bevorzugt ist es, daß zur Ansteuerung der einzelnen Lichtleiter eine dynamische Maske vorgesehen ist. Besonders bevorzugt ist es auch, daß zur Ansteuerung der einzelnen Lichtleiter ein Satz von statischen Masken vorgesehen ist.

10 Äußerst bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Vorrichtung, wobei die Lichtquelle ein solches Spektrum von Wellenlängen emittiert, welches die Entschützung von Nukleotiden, Nukleotidanaloga und Peptid-Nukleinsäurebausteinen zur Kettenverlängerung und zum Aufbau von Oligomeren bewirkt  
15 und daß zwischen dieser Lichtquelle und dem Substrat ein Bündel von Lichtleiterfasern angeordnet ist, in welche jeweils durch gezielte Ansteuerung selektiv Licht einkoppelbar ist und daß hinter dem Lichtleiterbündel die Festphase, auf der die Oligomersynthese stattfindet, präzise  
20 und starr positioniert ist und daß die Festphase, auf welcher die Oligomersynthese stattfindet, in einer Kammer angeordnet ist, in die durch weitere Vorrichtungen die zur DNA oder PNA Synthese notwendigen Lösungen und/oder Reagenzien an diese Festphase heranführbar sind.

25 Bevorzugt ist es erfindungsgemäß hierbei, daß man als Festphase, auf der die Oligomersynthese stattfindet, einen separaten Träger anordnet. Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner, daß die Enden der Lichtleiterfasern selbst  
30 die Festphase zur Durchführung der Oligomersynthese sind.

Ein weitere Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur photolithographischen Belichtung von biologischen Stoffen, wobei man diese auf einer Oberfläche  
35 oder am Ende eines Lichtleiters anordnet und mittels Licht, welches durch Lichtleiter geführt ist und aus ei-

ner Lichtquelle stammt, welche am anderen Ende der Licht-  
leiter angeordnet ist, belichtet, wobei man jeden Punkt,  
welcher einem Lichtleiterende gegenüberliegt, unabhängig  
von den anderen Punkten belichtet, wobei man das Belich-  
5 tungsmuster mittels einer Steuerungseinheit vorwählt.

Bevorzugt ist es hierbei nämlich zur Belichtung von DNA-  
oder PNA-Chips, daß man Licht der Wellenlängen verwendet,  
welches die Entschützung von Nukleotiden, Nukleotidanalogo  
10 ga und Peptid-Nukleinsäurebausteinen zur Kettenverlänge-  
rung und zum Aufbau von Oligomeren bewirkt und daß man  
zwischen dieser Lichtquelle und dem Substrat ein Bündel  
von Lichtleiterfasern anordnet, in welche jeweils durch  
gezielte Ansteuerung selektiv Licht eingekoppelt wird und  
15 daß man hinter dem Lichtleiterbündel die Festphase, auf  
der die Oligomersynthese stattfindet, präzise und starr  
positioniert und daß man die Festphase, auf welcher die  
Oligomersynthese stattfindet, in einer Kammer anordnet,  
in die man durch weitere Vorrichtungen die zur DNA oder  
20 PNA Synthese notwendigen Lösungen und/oder Reagenzien an  
diese Festphase heranzuführt.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner, daß man nach er-  
folgter Oligomerisierung auf den DNA- oder PNA-Chips wei-  
25 terhin die nachfolgenden Hybridisierungen mit einer Ziel-  
DNA durchführt.

Erfindungsgemäß ist ferner ein Verfahren, wobei man zur  
Durchführung des Verfahrens eine erfindungsgemäße Vor-  
30 richtung verwendet.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß die erfindungsge-  
mäßige Vorrichtung eine einfache und preiswerte photolitho-  
graphische Herstellung von DNA-Chips hoher Rasterdichte  
35 mit einem Belichtungscontrast von weit über 1:100 ermög-  
lichen. Dadurch wird erstmals die einfache Produktion von

qualitativ hochstehenden DNA-Chips in jedem beliebigen Labor möglich.

5 Die erfindungsgemäße Vorrichtung und das Verfahren lösen die gestellte Aufgabe auf völlig neuartige Art und Weise durch Kombination kommerziell erhältlicher Komponenten. Es ermöglicht die billige Herstellung von DNA-Chips in einer Qualität, wie sie vorher nicht möglich war.

10 Das grundlegende Konzept der erfindungsgemäßen Vorrichtung und des Verfahrens besteht darin, dass man ein bestimmtes Belichtungsmuster auf dem Substrat nicht durch gezielte Abdeckung von Rasterpunkten mit Hilfe einer statischen oder dynamischen Maske erzeugt, sondern indem man  
15 individuell jedem zu belichtenden Rasterpunkt das Licht direkt über einen optischen Lichtleiter zuführt. Es muss also über jedem Rasterpunkt das Ende einer optischen Lichtleiterfaser so angebracht sein, dass bei Lichteinkopplung in die Faser das am Ende austretende Licht genau den entsprechenden Rasterpunkt beleuchtet. Es werden  
20 folglich genau so viele Lichtleiterfasern benötigt wie Rasterpunkte vorgesehen sind. Um so beliebige Belichtungsmuster erzeugen zu können, muss unabhängig für jede einzelne Lichtleiterfaser gesteuert werden können, ob ihr  
25 zu einem gegebenen Zeitpunkt Licht eingekoppelt wird oder nicht. Durch gezieltes Einkoppeln bzw. nicht Einkoppeln von Licht in die richtigen Fasern kann man somit bei jedem Belichtungsschritt ausschliesslich jene Rasterpunkte belichten, die aktiviert werden müssen, während man alle  
30 anderen unbelichtet lässt.

Das gezielte Einkoppeln von Licht in die jeweils richtigen Fasern muss vollautomatisch elektronisch gesteuert werden können, damit die Methode einfach durchführbar  
35 ist. Eine mögliche technische Lösung ist, am Anfang jedes Lichtleiters eine eigene, elektrisch ein- und ausschaltba-

re Lichtquelle (z.B. eine Laserdiode richtiger Wellenlänge) anzubringen. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von kommerziell erhältlichen, elektrisch ansteuerbaren optische Schaltern. Es handelt sich dabei um eine Hardware-Komponente mit 2 Anschlüssen für 2 Lichtleiterfasern und einem elektrischen Steuerungseingang. Durch ein elektrisches Signal am Steuerungseingang kann bestimmt werden, ob die beiden Lichtleiterfasern optisch verbunden werden sollen oder nicht. Für jeden Rasterpunkt benötigt man somit einen optischen Schalter und zwei Lichtleiterfasern. Dem freien Ende der ersten Faser koppelt man permanent Licht ein, das freie Ende der zweiten Faser dient als Lichtausgang und wird über dem jeweiligen Rasterpunkt befestigt. Für die Lichteinkopplung genügt eine einzige Lichtquelle, wenn man alle Eingangsfasern entsprechend bündelt.

Für die elektrische Steuerung sind beide Methoden der gezielten Lichteinkopplung gleichwertig. Man benötigt lediglich eine Ansteuerelektronik, die jeden Rasterpunkt individuell adressieren kann. Grundsätzlich spielt es keine grosse Rolle, ob man dabei Leuchtdioden oder optische Schalter ansteuert.

Eine weitere Möglichkeit zur gezielten Lichteinkopplung in die einzelnen Fasern des Lichtleiterfaserbündels ist die Verwendung von automatisch positionierten statischen Masken (z.B. Photo- oder Lochmasken) oder einer elektronisch ansteuerbaren dynamischen Maske (z.B. LCD), welche man zwischen die Lichtquelle und die Eingangsseite des Faserbündels bringt. Mit den Masken kann man gezielt jene Fasereingänge verdecken, in die beim jeweiligen Belichtungsschritt kein Licht eingekoppelt werden soll. Die Masken können dabei geometrisch anders angeordnet und insbesondere viel größer sein als die zu belichtende Arrayfläche, da auf der Einkopplungsseite das Lichtleiter-

bündel beliebig aufgefächert bzw. in die einzelnen Fasern aufgetrennt werden kann.

Für die maximal erzielbare Chip-Rasterdichte ist es  
5 grundsätzlich irrelevant, wieviel Platz das Lichteinkopp-  
lungssystem (einzelne Lichtquellen, optische Schalter,  
statische oder dynamische Masken) beansprucht. Die Ra-  
sterdichte ist allein davon abhängig, wie dicht man die  
Faserenden bündeln kann, an denen das Licht austritt.  
10 Diese Möglichkeit der geometrischen Verdichtung stellt  
den wesentlichsten Nutzen der Erfindung dar. Bei einem  
typischen Faserdurchmesser um 100 Mikrometer kann man auf  
der Belichtungsseite ungefähr 10000 Rasterpunkte auf ei-  
nem Quadratzentimeter erreichen, was für viele Anwendun-  
15 gen hinreichend ist.

Falls es zu aufwendig ist, die über dem Substrat anzu-  
bringenden Lichtleiterfaserenden in einem gleichmässigen,  
rechtwinkligen Gitterraster anzuordnen, kann man auch ein  
20 ungeordnetes Faserbündel über dem Substrat befestigen.  
Die Punkte auf einem so angefertigten Chip sind dann  
nicht mehr rasterförmig, sondern zufällig und  
unregelmäßig angeordnet. Trotzdem sind bei allen Chips,  
die mit derselben Lichtleiteranordnung hergestellt worden  
25 sind, die Positionen der Punkte identisch. Grundsätzlich  
kann man wissen, welche Oligomersorte an welcher Stelle  
des Chips synthetisiert worden ist. Es genügt für eine  
gegebene Syntheseanordnung mit zufälliger  
Lichtfaserbündelung, ein einziges Mal nacheinander jedem  
30 einzelnen Lichtleiter Licht einzukoppeln, und mit einem  
hochauflösendem CCD-Detektor, der in die Substratebene  
gelegt wird, die Position der austretenden Lichtkegel  
festzustellen. Auf diese Weise kann man eine vollständige  
Tabelle mit der Zuordnung aller Ansteuerungsadressen zu  
35 den entsprechenden x-y Substratpositionen erstellen.  
Diese Information verwendet man später bei der Auswertung  
aller Chips, die mit der entsprechenden Anordnung

Chips, die mit der entsprechenden Anordnung hergestellt werden.

5 Für eine Auswertung nach dem Fluoreszenzmarkierungsverfahren kann man optional die selbe ungerasterte Lichtleiteranordnung verwenden, die man bei der Herstellung verwendet hat, nur dass man nun am anderen Faserende nicht Licht einkoppelt, sondern mit Photodetektoren das jetzt  
10 stellenweise auf der Substratseite eintretende Fluoreszenzlicht misst. Dazu muss man an Stelle der Lichtquelle(n) an jedem Faserende einen separaten Photodetektor anbringen. Ein solches optisches Lesesystem mit Lichtleitern kann die Chip-Detektion gegenüber der herkömmlichen Detektionsmethode mit CCD-Detektoren erhebliche vereinfachen.  
15

Eine sehr interessante und neuartige Anwendungsvariante des hier beschriebenen DNA-Chip Syntheseverfahrens ist die Synthese von Oligomeren direkt auf den Lichtleitern anstatt auf einem separaten Substrat. Dies kann erreicht werden, indem man die Lichtleiterfaser-Endflächen, durch die das Licht austritt, auf ähnliche Weise chemisch präpariert wie sonst bei herkömmlichen DNA-Chips  
20 Trägerfläche. Dadurch wird jedes Lichtleiterende selber zu einem kleinen, unabhängigen Träger, auf welchem man nun mit der üblichen photolithographischen Chemie genau eine Sorte von Oligomer synthetisieren kann. Das photoaktivierende Licht wird somit nicht mehr von aussen auf die Trägeroberfläche aufgestrahlt, sondern tritt direkt an  
25 der Trägeroberfläche aus dem transparenten, lichtleitenden Trägermaterial aus. Statt einer einzigen Trägerfläche mit vielen verschiedenen, kleinen Oligomerpunkten hat man nun eine Vielzahl von getrennten kleinen Trägerflächen mit je einer Sorte von Oligomer darauf. Wie bei den herkömmlichen Chips müssen die Oligomerpunkte dicht beieinander liegen, damit sie für eine effiziente Hybridisie-  
30  
35



rung verwendet werden können. Dies kann wie oben beschrieben durch dichte Bündelung der Faserenden erreicht werden.

5 Bei einer solchen Synthese auf Lichtleiterenden bleibt die hergestellte Oligomerpunkteschar untrennbar mit der zur Herstellung verwendeten Vorrichtung verbunden. Hybridisierung und anschliessende Detektion werden dann ebenfalls an den Lichtleiterenden vorgenommen, wobei man für  
10 eine Fluoreszenzdetektion wieder die Lichtleiter in umgekehrter Richtung zum Auslesen der Fluoreszenzsignale verwendet. Nach einem Synthese-Hybridisierung-Detektionszyklus kann man die Lichtleiterfaserspitzen chemisch reinigen und die Vorrichtung somit für eine Neue  
15 Synthese bereitmachen.

Die vorliegende Erfindung soll anhand der beigefügten Zeichnung näher erläutert werden.

20 Es zeigen:

Fig. 1 den schematischen Aufbau einer ersten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, bei welcher die Ansteuerung der Fasern durch optische Schalter dargestellt ist;  
25

Fig. 2 den schematisch Aufbau einer zweiten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, bei welcher die Ansteuerung der Fasern durch einzelne Lichtquellen dargestellt ist;  
30

Fig. 3 den schematischen Aufbau während der Belichtung eines separaten Trägers (Chip) und

Fig. 4 den schematischen Aufbau während der Belichtung, wobei sich das Substrat direkt an den faserenden befindet.

5 In Figur 1 ist ein erstes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung dargestellt. Aus der Lichtquelle A wird mittels der Lichtleiter F das Licht über die elektrisch angesteuerten optischen Schalter B auf den Array-Träger C geleitet. Die Steuerung S, vorzugsweise  
10 ein Computer, sorgt für die entsprechende Ansteuerung der einzelnen Schalter B in vorgegebener Weise in Form einer dynamischen oder statischen Maske.

15 In Figur 2 ist ein zweites Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung dargestellt. Aus einer Vielzahl von der Lichtquellen A wird mittels der Lichtleiter F das Licht auf den Array-Träger C geleitet. Die Steuerung S, vorzugsweise ein Computer, sorgt für die entsprechende Ansteuerung der einzelnen Schalter A in vorgegebener Weise. Auch hier kann die Ansteuerung in Form einer  
20 dynamischen oder statischen Maske erfolgen.

Figur 3 zeigt im Detail, wie die einzelnen Substratpunkte E auf dem Array-Träger C durch die Lichtleiterfasern F  
25 belichtet werden.

In Figur 4 ist gezeigt, daß die Substrate direkt an der Enden der Lichtleiterfasern F angeordnet sind.

30 Dem Fachmann ist klar, wie die einzelnen Bauteile in einer erfindungsgemäßen Vorrichtung anzuordnen sind. Auch die entsprechende Programmierung der Steuerung mittels Computerprogrammen ist dem Fachmann an sich bekannt.

## Bezugszeichenliste

- A: Lichtquelle
- 5 B: elektrisch angesteuerter optischer Schalter
- C: Array-Träger
- D: Substrat an den Faserenden
- E: Substratpunkte auf dem Array-Träger
- F: Lichtleiterfaser
- 10 S: Steuerung (Computer)

## Patentansprüche

- 5 1. Vorrichtung zur photolithographischen Belichtung von biologischen Stoffen, umfassend mindestens eine Lichtquelle, ein Lichtleiterbündel und eine Steuerungseinheit, wobei jeder der Lichtleiter unabhängig voneinander mit Licht ansteuerbar und/oder Licht in diesen einkoppelbar ist.
- 10 2. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle monochromatisches oder kontinuierliches Licht in einem Wellenlängenbereich von 100 bis 800 nm aussendet.
- 15 3. Vorrichtung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle ein Laser, eine Leuchtdiode, eine Metaldampflampe, eine Gasentladungslampe, eine Gasanregungslampe, eine Glühfadenlampe oder eine Lichtbogenlampe ist.
- 20 4. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ansteuerung der einzelnen Lichtleiter Leuchtdioden und/oder optische Schalter angeordnet sind.
- 25 5. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zu belichtende Stoffe direkt an den Enden der Lichtleiter aufgebracht sind.
- 30 6. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zu belichtende Stoffe auf einem separaten Träger angeordnet sind.
- 35 7. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zu belichtende Stoffe auf

einem separaten Träger angeordnet sind, wobei dieser Träger ein DNA-Chip, ein PNA-Chip oder ein Peptid-Chip ist.

- 5      8. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung zusätzlich mindestens einen Detektor umfaßt.
- 10      9. Vorrichtung gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Detektoren derart angeordnet ist, daß dieser das zur Belichtung verwendete Licht erfaßt und/oder mindestens ein Detektor derart angeordnet ist, daß dieser das von den belichteten Stoffen reflektierte und/oder durch Fluoreszenz erzeugte  
15      Licht erfaßt und daß zur Lichtführung für die Detektoren gegebenenfalls Lichtleiter und/oder Lichtleiterbündel vorgesehen sind.
- 20      10. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektoren CCD-Detektoren und/oder CCD-Kameras sind.
- 25      11. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ansteuerung der einzelnen Lichtleiter eine dynamische Maske vorgesehen ist.
- 30      12. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ansteuerung der einzelnen Lichtleiter ein Satz von statischen Masken vorgesehen ist.
- 35      13. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle ein solches Spektrum von Wellenlängen emittiert, welches die Entschützung von Nukleotiden, Nukleotidanaloga und

- Peptid-Nukleinsäurebausteinen zur Kettenverlängerung und zum Aufbau von Oligomeren bewirkt und daß zwischen dieser Lichtquelle und dem Substrat ein Bündel von Lichtleiterfasern angeordnet ist, in welche jeweils durch gezielte Ansteuerung selektiv Licht ein-
- 5 koppelbar ist und daß hinter dem Lichtleiterbündel die Festphase, auf der die Oligomersynthese stattfindet, präzise und starr positioniert ist und daß die Festphase, auf welcher die Oligomersynthese stattfindet,
- 10 det, in einer Kammer angeordnet ist, in die durch weitere Vorrichtungen die zur DNA oder PNA Synthese notwendigen Lösungen und/oder Reagenzien an diese Festphase heranzuführbar sind.
- 15 14. Vorrichtung gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man als Festphase, auf der die Oligomersynthese stattfindet, einen separaten Träger anordnet.
- 20 15. Vorrichtung gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Enden der Lichtleiterfasern selbst die Festphase zur Durchführung der Oligomersynthese sind.
- 25 16. Verfahren zur photolithographischen Belichtung von biologischen Stoffen, wobei man diese auf einer Oberfläche oder am Ende eines Lichtleiters anordnet und mittels Licht, welches durch Lichtleiter geführt ist und aus einer Lichtquelle stammt, welche am anderen Ende der Lichtleiter angeordnet ist, belichtet, wobei
- 30 man jeden Punkt, welcher einem Lichtleiterende gegenüberliegt, unabhängig von den anderen Punkten belichtet, wobei man das Belichtungsmuster mittels einer Steuerungseinheit vorwählt.
- 35 17. Verfahren gemäß Anspruch 16, nämlich zur Belichtung von DNA- oder PNA-Chips, dadurch gekennzeichnet, daß

man Licht der Wellenlängen verwendet, welches die  
Entschützung von Nukleotiden, Nukleotidanaloga und  
Peptid-Nukleinsäurebausteinen zur Kettenverlängerung  
und zum Aufbau von Oligomeren bewirkt und daß man  
5 zwischen dieser Lichtquelle und dem Substrat ein Bündel  
von Lichtleiterfasern anordnet, in welche jeweils  
durch gezielte Ansteuerung selektiv Licht eingekoppelt  
wird und daß man hinter dem Lichtleiterbündel  
die Festphase, auf der die Oligomersynthese stattfindet,  
10 präzise und starr positioniert und daß man die  
Festphase, auf welcher die Oligomersynthese stattfindet,  
in einer Kammer anordnet, in die man durch weitere  
Vorrichtungen die zur DNA oder PNA Synthese notwendigen  
Lösungen und/oder Reagenzien an diese Festphase  
15 heranzuführt.

18. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet,  
daß man nach erfolgter Oligomerisierung auf den DNA-  
oder PNA-Chips weiterhin die nachfolgenden Hybridisierungen  
20 mit einer Ziel-DNA durchführt.

19. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet,  
daß man zur Durchführung des Verfahrens eine Vorrichtung  
gemäß Anspruch 1 verwendet.

25





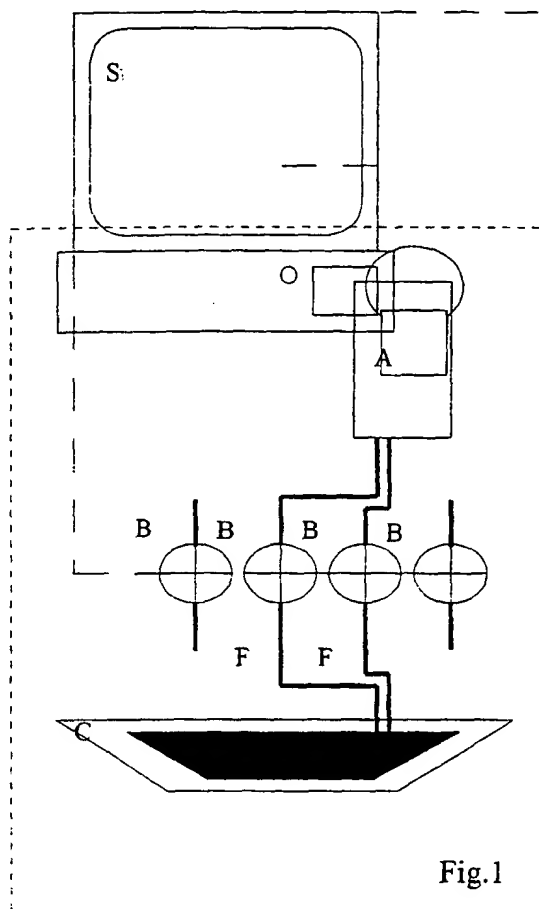


Fig.1

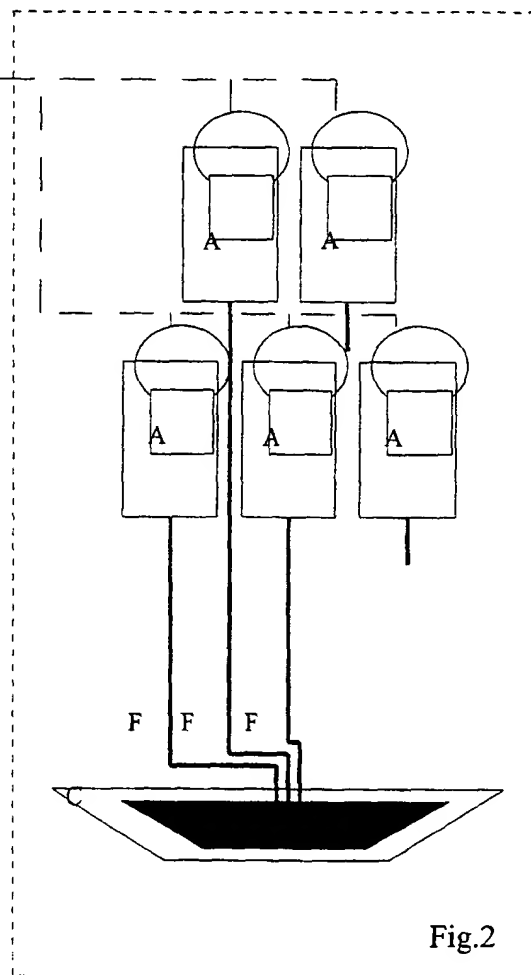


Fig.2

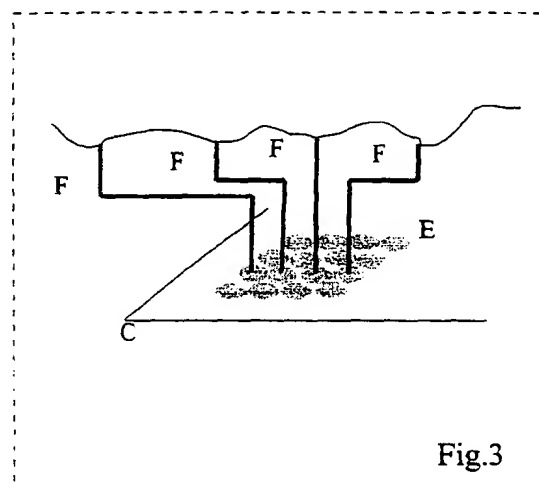


Fig.3

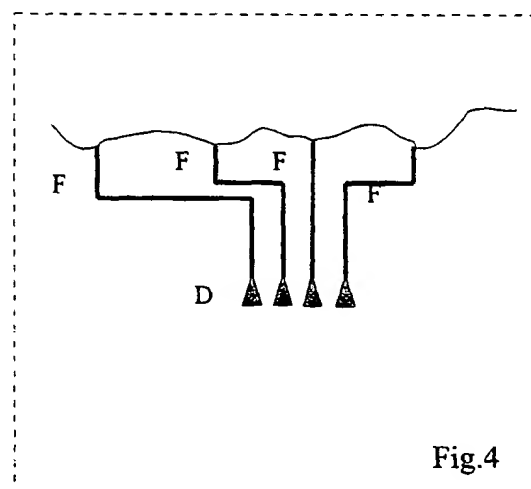


Fig.4



(43) Date of A Publication 02.03.1994

(21) Application No 9218420.9

(22) Date of Filing 29.08.1992

(71) Applicant(s)  
**Thermotor Limited**

**(Incorporated in the United Kingdom)**

**Beacon House, Station Road, East Preston,  
LITTLEHAMPTON, West Sussex, BN16 3AA,  
United Kingdom**

(72) Inventor(s)  
**Paul Grosvenor**

(74) Agent and/or Address for Service  
**M J Hoolahan**  
**Kirklee, Church Street, West Chiltington,**  
**PULBOROUGH, West Sussex, RH20 2JW,**  
**United Kingdom**

(51) INT CL<sup>5</sup>  
G09F 9/30

(52) UK CL (Edition M )  
G5C CA334 CA344 CEPL CHA

(56) Documents Cited  
 GB 1454060 A    US 4178708 A    US 3878399 A  
 US 3721974 A

(58) Field of Search  
UK CL (Edition K ) G5C CEPL CHA  
INT CL<sup>5</sup> G09F  
**ONLINE DATABASES : WPI CLAIMS**

(54) **A display or sign.**

(57) An illuminated sign is provided in which the sign face 10 has an array of pixels 11 which are fed via an optical fibre harness 20. Between the light source 12 and the sign face 10, the harness is interrupted by a gap and a coded punched tape 22 run through the gap. The punched tape 22 has coded holes punched in it to determine what is shown on the sign face. An electronic controller coupled to an aspect or datum sensor is used to control the position of the tape and the switching on and off of the lights, which are switched off during movement of the tape.

FIG. 1

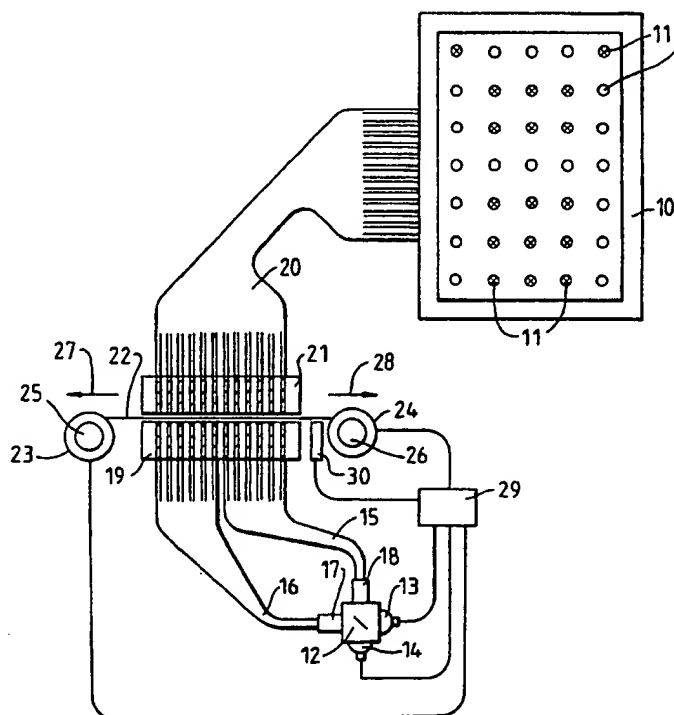


FIG. 1

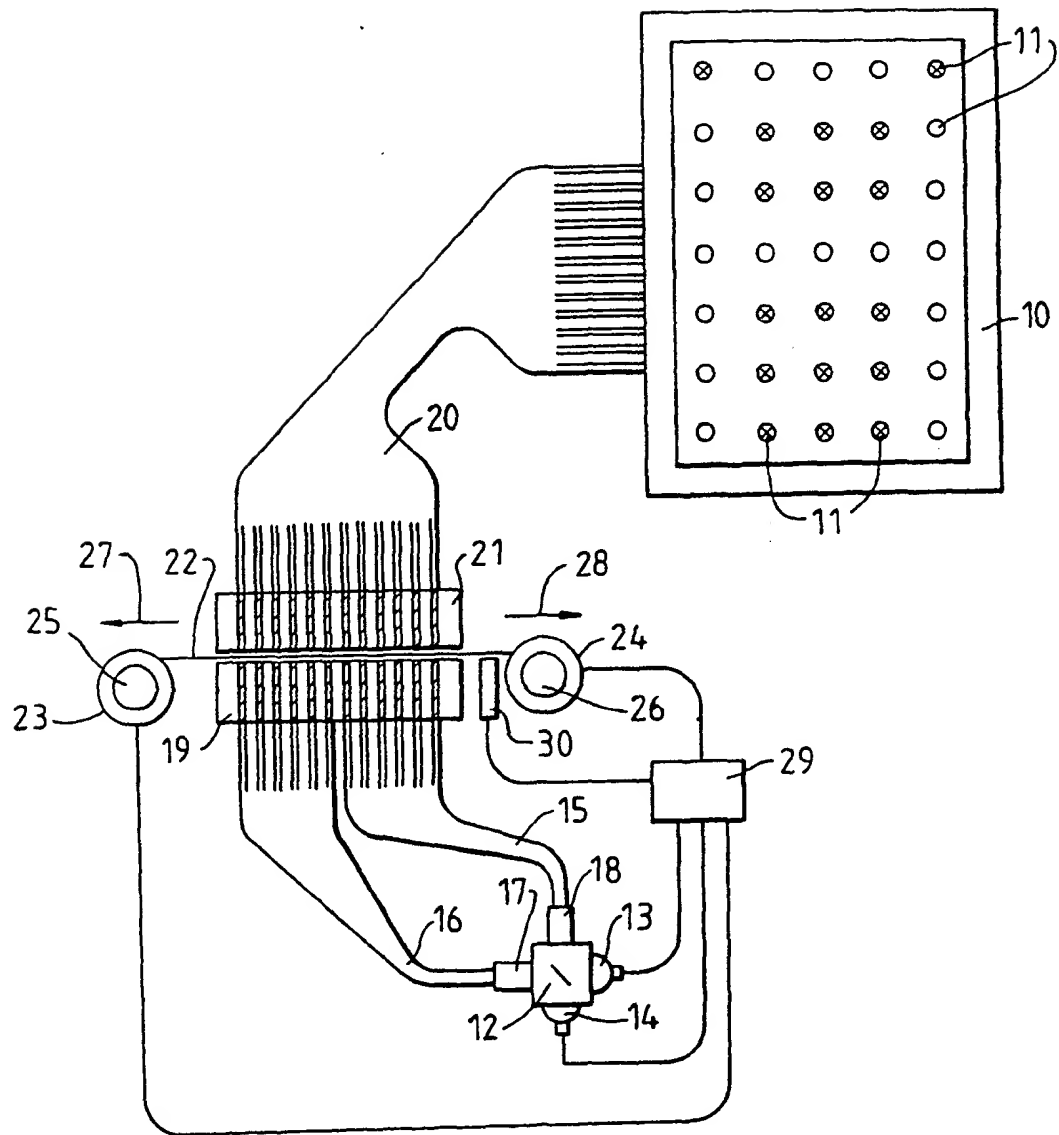


FIG. 2

2 / 2

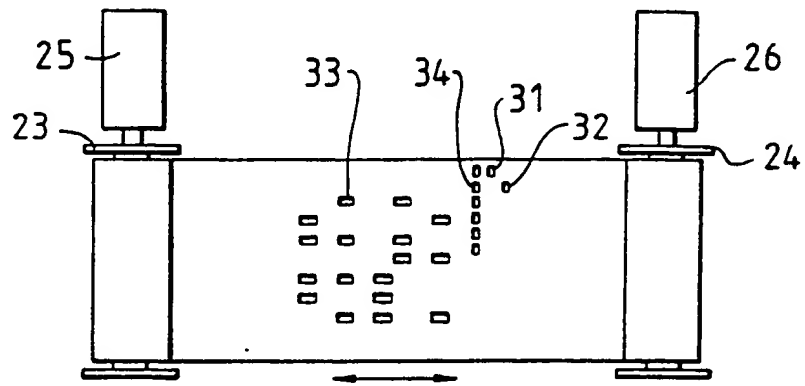


FIG. 3

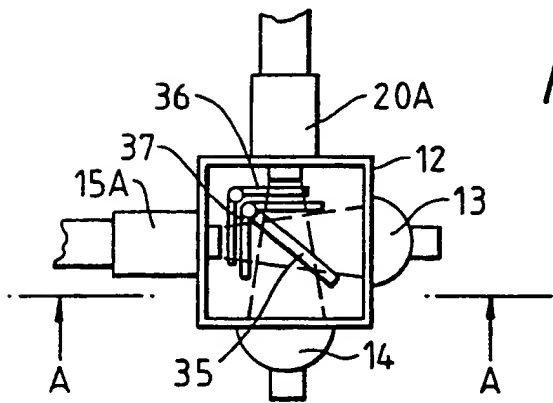
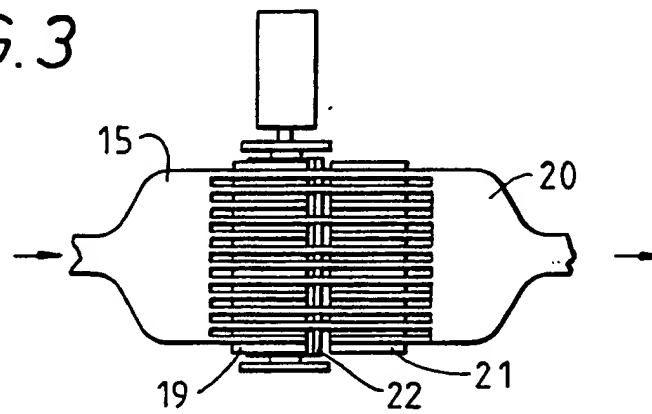
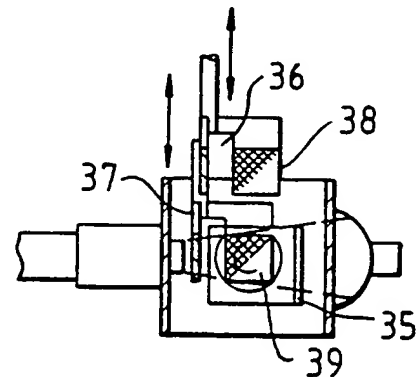


FIG. 4

FIG. 5



"A DISPLAY OR SIGN FACE"

This invention relates to a display or sign face comprising a matrix of points, known as pixels, which may be selectively illuminated to display a selected letter, number or other symbol or pattern.

An object of the invention is to provide means to select the  
5 particular letter, number or other symbol or pattern which can be operated quickly and accurately.

According to this invention, there is a display or sign face comprising a matrix of points, or pixels, which may be selectively illuminated to display a selected letter, number or other symbol or  
10 pattern, light being supplied from a light source through a harness of input optical fibres, the free ends of which are supported in a block, a second harness of output optical fibres being provided to convey light from a second block to the matrix of points or pixels on the display or sign face, the first and second blocks lying  
15 closely adjacent each other and a coded punched tape being located in a gap between the two blocks, the punched tape incorporating a series of groups of punched holes which allow light from selected input fibres to enter selected output fibres so as to display a particular letter, number or other symbol or pattern.

20 The tape is preferably carried on motor-driven spools and its position is determined by an electronic controller which receives

signals from an aspect or datum sensor to indicate the position of the tape.

Preferably the controller includes means to switch the light source off during movement of the tape and to switch it on when a selected  
5 point on the tape is reached.

The electronic controller includes means to operate one or more drive motors to move the tape.

The light source is preferably in the form of a light box with fibre harnesses connected to two sides of the box and two sources of light  
10 being located in the other two sides of the box, the light being directed through a splitter so that each harness receives part of the light directly from one light source and a second part of the light indirectly from the other light source. The splitter may, for example, be a splitter mirror or a split fibre harness, or other  
15 means of sharing light.

There may be a number of light boxes or a single light box and the light box or boxes may be provided with two sets of colour filters which may be interposed between the light source and the adjacent end of the harness where it enters the box, the colour filters being  
20 moveable into and out of the light path.

The tape may be provided with reference slots at spaced intervals to provide a signal to the aspect/datum sensor to show the precise

position of the tape. The tape may also have coded slots at intervals to provide signals to the sensor indicating the number, letter or other sign which will be displayed on the sign face.

Preferably the aspect punched holes in the tape are elongated in  
5 the longitudinal direction of the tape, and the positioning punched holes are elongated in the vertical plane.

The motors which drive the tape are preferably arranged so that one motor drives in one direction while the other motor free-wheels and vice versa.

10 In the accompanying drawings:-

Figure 1 is a schematic representation of one display or sign face incorporating the present invention;

Figure 2 is a plan view of the tape shown in Figure 1;

Figure 3 is an end elevation of the tape and illustrates how the  
15 ends of the optical fibres are incorporated in blocks;

Figure 4 is an elevation of one light box; and

Figure 5 is a section on line A--A shown in Figure 4.

Figure 1 shows a sign face 10 incorporating a matrix of 35 light points or pixels 11 some of which are shown illuminated to form a  
20 letter A.

Light is provided from a light box 12 provided with two light sources, such as halogen light bulbs 13 and 14, two light input



harnesses of optical fibres 15 and 16, or a split harness, are shown with their ends 17 and 18 entering the box 12 on two sides of the box. The other ends of the optical fibres in each harness are supported in a block 19. An output harness of optical fibres 20  
5 conveys light from a second block 21 to the sign face 10. Each pixel 11 may have one or multiple individual optical fibres feeding into it. What is displayed on the sign face 10 is determined by a coded tape 22 which is arranged to run between the blocks 19 and 21 and is carried by tape spools 23 and 24 driven by motors 25 and 26.  
10 Motor 25 drives in the direction of arrow 27 whilst motor 26 free-wheels. Similarly, motor 26 drives in the direction of arrow 28 whilst motor 25 free-wheels.

The display face is controlled by an electronic controller 29 which controls the motors 25 and 26 and also switches on and off the lights  
15 13 and 14. The electronic controller is fed with signals from an aspect or datum sensor 30 which picks up reference slots 31 and 32 (Fig. 2) on the tape 22. This enables the precise position of the tape to be determined to ensure that slots 33 in the tape 22, which determine what is displayed on the sign face, are correctly  
20 positioned.

A further coded set of slots 34 is used to provide a signal through the aspect/datum sensor to the electronic controller 29 to show the particular symbol etc. which is being displayed.

Figure 3 shows in more detail how the harnesses are fed into the fibre blocks and the coded tape lies in the narrow space between the blocks in order to ensure that light coming through the blocks is not lost due to spreading of the beams. The space between the  
5 blocks is kept to the minimum possible. For instance, this space may be as little as 0.8mm and the tape may be 0.5mm.

Figure 4 shows in more detail one of the light boxes 12. The splitter mirror 35 is set at a 45-degree angle in the box; light from the halogen light bulbs 13 and 14 is split. For instance, the  
10 light from bulb 13 will go directly across to the harness end 15A but a proportion of the light will be reflected by splitter mirror 35 so as to be directed to the harness end 20A. Similarly, light from halogen bulb 14 will be split, part of it going to harness end 28 directly and part of it being reflected to harness end 15A. This  
15 ensures that if one light bulb should fail, light will still go to each harness end from the other halogen bulb. In the light box 12 there are two colour filter assemblies 36 and 37 which can be seen more clearly in Figure 5. Filter assembly 36 carries a green filter 38 and filter assembly 37 carries a red filter 39. The  
20 filter assemblies are operable by solenoids so as to place either a green filter or a red filter between the adjacent harness end and the splitter mirror. If colour is not required, they can both be withdrawn.

The electronic controller 29 is provided with a keyboard to enable the user to select the desired symbol, letter or figure. When the displayed symbol is to be changed, the operator presses the appropriate key. This immediately turns the light bulbs off and  
5 operates the appropriate one of the spool drive motors to move the tape to a new position. When the desired position is reached, the reference slots shown in Figure 2 will provide a signal via a photo-electric cell (not shown) to the electronic controller which will ensure that the tape is positioned accurately to enable the  
10 desired symbol to be displayed. Once the desired symbol position is reached, the tape stops and the light is automatically turned on again.

Slots 33 in the tape are elongated to accommodate tape wear and to avoid the necessity of overly precise positioning.

15 As mentioned above, the light coming from the fibre ends within block 19 will tend to spread slightly as it crosses the gap. To accommodate this, the fibres in harness 20 may be of greater diameter than the fibres in harnesses 15 and 16 and the holes in the block 21 may be correspondingly enlarged compared with the holes in  
20 block 19. The use of a larger diameter fibre in harness 20 enables the whole of the light to be picked up despite any spreading which occurs in the gap. Glass fibres are used in harnesses 15 and 16

and may be used in harness 20, but if a larger fibre is used in accordance with this modification, then plastic optical fibres are preferably used.

In a preferred design, there will be a row or multiple rows each  
5 containing a given number of character units, the whole being controlled via a computer or interface from a control centre to display any alpha numeric messages or pre-programmed pictograms or both.

CLAIMS

1. A display or sign face comprising a matrix of points, or pixels which may be selectively illuminated to display a selected letter, number or other symbol or pattern, light being supplied from a light source through a harness of input optical fibres, the free  
5 ends of which are supported in a block, a second harness of output optical fibres being provided to convey light from a second block to the matrix of points or pixels on the display or sign face, the first and second blocks lying closely adjacent each other and a coded punched tape being located in a gap between the two blocks,  
10 the punched tape incorporating a series of groups of punched holes which allow light from selected input fibres to enter selected output fibres so as to display a particular letter, number or other symbol or pattern.
2. A display or sign face according to Claim 1 and in which the  
15 tape is carried on motor-driven spools and its position is determined by an electronic controller which receives signals from an aspect or datum sensor to indicate the position of the tape.
3. A display or sign face according to Claim 1 or Claim 2 and in which the controller includes means to switch the light source off  
20 during movement of the tape and to switch it on when a selected point on the tape is reached.
4. A display or sign face according to any preceding Claim and in which the electronic controller includes means to operate one or more drive motors to move the tape.

5. A display or sign face according to any preceding Claim and in which the light source is in the form of a light box with fibre harnesses connected to two sides of the box and two sources of light located in the other two sides of the box, the light being directed  
5 through a splitter so that each harness receives part of the light directly from one light source and a second part of the light indirectly from the other light source.
6. A display or sign face according to Claim 5 and in which there are a number of light boxes, or a single light box, and the light  
10 box or boxes are provided with two sets of colour filters which may be interposed between the light source and the adjacent end of the harness where it enters the box, the colour filters being moveable into and out of the light path.
7. A display or sign face according to any preceding Claim and  
15 in which tape is provided with reference slots at spaced intervals to provide a signal to the aspect/datum sensor to show the precise position of the tape.
8. A display or sign face according to any preceding Claim in which the tape has coded slots at intervals to provide signals to  
20 the sensor indicating the number, letter or other sign which will be displayed on the sign face.
9. A display or sign face according to any preceding Claim and in which the aspect punched holes in the tape are elongated in the longitudinal direction of the tape, and the positioning holes are  
25 elongated in the vertical plane.

10. A display or sign face according to any preceding Claim and in which the motors which drive the tape are arranged so that one motor drives in one direction while the other motor free-wheels and vice versa.
- 5 11. A display or sign face according to any preceding Claim and in which the optical fibres in the second harness are of greater diameter than the optical fibres in the first harness to accommodate spreading of light.
- 10 12. A display or sign face according to any preceding Claim and in which the gap is no greater than 0.8mm and the tape is no thicker than 0.5mm.
13. A display or sign face substantially as hereinbefore particularly described and as illustrated in the accompanying drawings.

**Relevant Technical fields**

- (i) UK Cl (Edition K) G5C (CHA, CEPL)
- (ii) Int Cl (Edition 5) G09F

**Search Examiner**

G M PITCHMAN

**Databases (see over)**

- (i) UK Patent Office
- (ii) ONLINE DATABASES: WPI, CLAIMS

**Date of Search**

9 NOVEMBER 1992

Documents considered relevant following a search in respect of claims

1 TO 13

Category (see over)	Identity of document and relevant passages	Relevant to claim(s)
X	GB 1454060 (MATSUSHITA) see page 2 line 111 to page 3 line 33	1,2,8,9, 10
X	US 4178708 (FLETCHER) see column 2 line 62 to column 3 line 22	1
X	US 3878399 (HIGUCHI) see column 2 line 12 to column 3 line 31	1
X	US 3721974 (JENIFER) see column 7 line 39 to column 11 line 15	1,2,4



### Categories of documents

**X:** Document indicating lack of novelty or of inventive step.

**Y:** Document indicating lack of inventive step if combined with one or more other documents of the same category.

**A:** Document indicating technological background and/or state of the art.

**P:** Document published on or after the declared priority date but before the filing date of the present application.

**E:** Patent document published on or after, but with priority date earlier than, the filing date of the present application.

**&:** Member of the same patent family, corresponding document.

**Databases:** The UK Patent Office database comprises classified collections of GB, EP, WO and US patent specifications as outlined periodically in the Official Journal (Patents). The on-line databases considered for search are also listed periodically in the Official Journal (Patents).



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑩ DE 198 23 454 A 1

⑳ Aktenzeichen: 198 23 454.6  
㉔ Anmeldetag: 18. 5. 98  
㉕ Offenlegungstag: 25. 11. 99

㉙ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 07 H 21/04**  
C 07 H 1/00  
C 07 B 61/00  
C 07 K 1/04  
C 07 K 1/06  
C 12 N 15/10  
G 03 F 1/00  
G 03 F 7/20

DE 198 23 454 A 1

㉙ Anmelder:  
Epigenomics GmbH, 10435 Berlin, DE  
  
㉚ Vertreter:  
Schubert, K., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,  
10119 Berlin

㉛ Erfinder:  
Heuermann, Arno Svend, Dipl.-Ing., 13359 Berlin,  
DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

㉜ Verfahren zur photolithographischen Herstellung von DNA, PNA und Protein Chips

DE 198 23 454 A 1

## Beschreibung

## Stand der Technik

Als DNA-Chips werden Oberflächen bezeichnet, welche auf kleinster Fläche eine große Anzahl verschiedener DNA Moleküle fixiert oder synthetisiert werden. Von jeder beliebigen Punkt eines solchen Chips ist in der Regel bekannt, welche DNA sich an diesem befindet. Eine wichtige Klasse dieser Chips ist dadurch gekennzeichnet, daß kurze Sequenzen, sogenannte Oligonukleotide in situ auf der Chip-Oberfläche synthetisiert werden. Dadurch wird die Zahl der notwendigen chemischen Reaktionsschritte, die anderenfalls zur Synthese riesiger Zahlen von verschiedenen Sequenzen notwendig wären erheblich eingeschränkt.

DNA-Chips können auf mehrere Arten hergestellt werden. Die einfachste aber teuerste und aufwendigste ist das Aufbringen vorher synthetisierter Moleküle mittels Pipettieranlagen. Solche Methoden werden in Zukunft wahrscheinlich nicht konkurrenzfähig sein.

Methoden, die sich die oben genannten Vorteile der in situ Synthese zunutze machen lassen sich in rein chemische und photolithographische Verfahren unterteilen. Chemische Verfahren beruhen auf dem Aufbringen der zur Oligonukleotidsynthese notwendigen Lösungen mittels aufwendiger Pipettieranlagen. Daher sind diese zwar einer konventionellen (nicht in situ) Synthese hinsichtlich Geschwindigkeit und Kosteneffizienz überlegen, können aber bei weitem nicht mit den Möglichkeiten der photolithographischen Synthesen konkurrieren.

Für die chemische Synthese von Oligonukleotiden werden Nukleotidbausteine eingesetzt, welche zwei Arten von Schutzgruppen tragen. Einerseits solche Schutzgruppen, die Funktionalitäten der Basen schützen, und andererseits eine anders geartete Schutzgruppe, welche lediglich die Kettenverlängerung um einen einzigen Baustein zuläßt. Die Abspaltung, dieser letzten Schutzgruppe ist wesentlich für die in situ Synthese. Es müssen an extrem vielen Punkten einer Matrix spezifisch Schutzgruppen quantitativ abgespalten werden, ohne an den anderen Punkten eine solche Abspaltung zu verursachen. Chemische Methoden stoßen dabei sehr schnell an die Grenze der Auflösung der Pipettiersysteme. Die einzelnen Tropfen, die aufgetragen werden sind zu groß und überlappen ab einer bestimmten Dichte.

Daher werden für DNA-Chips hoher Dichte heute photolithographische Synthesewege gewählt. Dabei sind die Schutzgruppen der Nukleotidbausteine photochemisch abspaltbar. Durch Bestrahlung einzelner Punkte der Synthesoberfläche kann die Kettenverlängerung spezifisch nur an diesen Punkten ausgelöst werden. Zwei Wege sind gangbar eine große Auflösung und damit Belegungsdichte auf solchen Oberflächen zu erreichen. Zum einen wird jeder einzelne Punkt einer Oberfläche einzeln mit einem Lichtstrahl – zum Beispiel einem Laser – angesteuert und so die Schutzgruppen der Nukleotidketten nur an den angestrahlten Punkten entschützt werden. Die notwendige Bestrahlungsdauer ist aber so lang, daß diese Verfahren noch zu zeitaufwendig sind. Außerdem wird DNA durch Laserbeschuß zerstört. Die möglicherweise Zehntausende von Punkten müssen nacheinander angesteuert werden. Möglich wären auch komplexe zum Beispiel Spiegelmechanismen, welche viele Punkte gleichzeitig ansteuern. Solche Vorrichtungen sind aber zur Zeit nicht erhältlich.

Die zweite und heute gebräuchlichste Methode ist es, Masken zwischen der Chip-Oberfläche und einer Lichtquelle zu installieren. In jedem Syntheseschritt wird so das Licht der Lichtquelle nur an den Punkten zur Chip-Oberfläche durchgelassen, an denen eine Entschätzung stattfinden

soll. Daher können praktisch beliebig viele Reaktionen parallel durchgeführt werden. Bei vier Nukleotidbausteinen müssen also für eine Verlängerung aller Oligonukleotide um ein Nukleotid vier verschiedene Masken sequentiell über der Oberfläche positioniert werden. Um also eine Länge aller Oligonukleotide von zum Beispiel 30 Nukleotideinheiten zu erreichen müssen 120 Masken hergestellt werden und nacheinander extrem genau über der Oberfläche positioniert werden.

## Nachteile des Standes der Technik

Je größer die Auflösung des Chips, desto schwieriger ist die Positionierung der Masken über der Oberfläche. Extrem aufwendige Technologie ist dafür erforderlich.

Die Herstellungskosten von DNA-Chips liegen daher bei einigen Hunderttausend Mark. Außerdem, je mehr einzelne Punkte auf einem solchen Chip synthetisiert werden sollen, desto aufwendiger wird die Herstellung der Masken. Im Prinzip kann heute ein solcher Chip deswegen nur in eigens konstruierten Fabriken hergestellt werden. Voraussetzung zur Herstellung solcher Chips ist auch die Installation aller dafür notwendigen Geräte in staubfreien Reinräumen. Es besteht aber ein erheblicher Markt an solchen Chips, die von Firmen und Laboratorien auf ad hoc Basis selber entworfen und hergestellt werden könne. Dies verbietet sich nach dem Stand der Technik.

## Aufgabenstellung

Das vorgeschlagene erfindungsgemäße Verfahren soll es ermöglichen in Zukunft auf die Etablierung eigener Fabriken für die Herstellung von DNA und PNA-Chips verzichten zu können. Das Verfahren soll den aufwendigsten Schritt der Chipherstellung, die Herstellung und Positionierung der Masken überflüssig machen. Außerdem soll auf Reinräume verzichtet werden können, die Synthese also in jedem Labor möglich werden.

## Lösung der Aufgabenstellung

Das erfindungsgemäße Verfahren löst die gestellte Aufgabe auf völlig neuartige Art und Weise durch Kombination kommerziell erhältlicher Komponenten. Im Vergleich zu heute modernen Verfahren verbilligt sich daher die Synthese von DNA- und PNA-Chips um mehrere Größenordnungen. Die Monopolstellung einiger weniger großer Fabriken kann so gebrochen werden und die Herstellung von kostengünstigen DNA-Chips der Allgemeinheit zugänglich gemacht werden.

Das grundlegende Konzept des Verfahrens ist die an sich bekannte Tatsache, daß Flüssigkristall-Matrixen als dynamisch ansteuerbare photolithographische Masken verwendet werden können (Bertsch et al., J. Photochem. & Photobiol. 107, 275–281 (1997)). Diese Technik ist allerdings noch nie auf dem Gebiet der Synthese von biochemischen Polymeren auf Oberflächen eingesetzt oder diskutiert worden.

Unser Verfahren eliminiert die Notwendigkeit sehr viele verschiedene photolithographische Masken herzustellen. Das von uns benutzte Flüssigkristallgitter ist durch aufgedampfte Transistoren an jedem Punkt der Matrix ansteuerbar. Die Auflösung der herzustellenden Chips ist daher nur durch die Zahl der einzeln ansteuerbaren Zellen des Flüssigkristalls abhängig. Jede Maske wird also anstelle einer physikalischen Anordnung von Löchern in einer lichtundurchlässigen Oberfläche durch die rein elektronische Ansteuerung der einzelnen Zellen erreicht. Die Auflösung der

Maske – durch die minimale Größe der einzelnen Zellen limitiert – kann dadurch praktisch unendlich gesteigert werden, daß eine größere Flüssigkristallmatrix verwendet wird als der letztendliche Chip. Das Licht, welches durch diese große dynamische Maske fällt kann dann hinter dieser durch optische Linsen auf die Oberfläche teleskopiert werden. Durch diese Technik kann auch der sonst erfolgende Ausbleicheffekt der Flüssigkristalle verhindert werden: Weniger Licht fällt pro Fläche auf die Flüssigkristalle, als hinter dieser für die Entschützung auf der Chip-Oberfläche benötigt wird.

Anstelle des nach dem Stand der Technik notwendigen Austauschs von Masken nach jedem Syntheseschritt wird im erfindungsgemäßen Verfahren einfach nur die Ansteuerung des Flüssigkristalls vom Computer geändert. Zwischen den Entschützungen liegen bei der Synthese chemische Schritte, für welche keine Lichtenergie notwendig ist. Dies findet auch innerhalb der verfahrensgemäßen Vorrichtung statt, ohne daß die Bewegung des Chips oder der Maske notwendig wäre. Durch die starre Anordnung und extrem präzise Positionierung von Chip, Maske und Lichtquelle, werden mechanische Probleme wie die nach dem Stand der Technik oft notwendige Neupositionierung vermieden. Eine verfahrensgemäße Vorrichtung kann also mechanisch sehr einfach ausgelegt sein.

Technisch zeichnet sich eine erfindungsgemäße Vorrichtung dadurch aus, daß Chip-Rohlinge hergestellt werden, welche entweder chemisch aktivierbare Oberflächen (an welche ein beliebiger Nukleotidbaustein gekoppelt werden kann) aufweisen oder schon mit geschützten, photochemisch absaltbaren Molekülen belegt sind. Solche Moleküle können zum Beispiel direkt einzelne Nukleotide oder PNA Bausteine darstellen, welche in der Produktion gleichmäßig auf der Oberfläche angebracht worden sind. Eine wesentliche Eigenschaft dieser Rohlinge ist deren Verpackung. Diese werden unter Reinbedingungen verschmutzungsfrei hergestellt und so verpackt, daß sie auf eine Art und Weise in die Vorrichtung eingeführt werden können, die jeden Kontakt mit einer nicht gefilterten "normalen" Laborumgebung ermöglicht. Zum Beispiel kann eine solche Verpackung mit einer durchstoßbaren Folie versiegelt werden. Eine derart verpackter Rohling kann durch eine Dichtung in die Vorrichtung eingeschoben werden, wobei der eigentliche Rohling aus der Verpackung herausgedrückt wird, die Folie durchstößt und dann in der eigentlichen Vorrichtung einrastet (Fig. 1). Damit ist die genaue und unverrückbare Positionierung des Rohlings während allen weiteren Schritten gesichert. Außerdem wird Verschmutzung ausgeschlossen.

Nach dem Einrasten kommt ein solcher Rohling unterhalb der Flüssigkristallmatrix zu liegen. Der Rohling bildet so den Boden, die untere Elektrodenplatte der Flüssigkristallmatrix die Decke eines sehr kleinen Hohlraumes, der auch an den Seiten abgedichtet ist. Über mehrere Zuleitungen werden chemische Lösungen in diesen Hohlraum eingeführt und dieser auch luft- oder gasgetrocknet werden. Die Decke des Hohlraumes kann aber auch durch eine andere Fläche als direkt einer der Bestandteile der Flüssigkristallanzeige sein. Zum Beispiel kann dieser aus einem letzten Teil der Optik bestehen, welche das durch die verschiedenen Zellen des Flüssigkristalls durchgelassene Licht fokussieren.

Das im Anspruch beschriebene Verfahren soll aber auch andere technische Ausführungen einschließen.

Die Flüssigkristallmatrix selber besteht in an sich bekannter Art und Weise aus Flüssigkristallen, welcher zwischen zwei planen Schichten eines solchen Materials eingeschlossen werden, welches für die für die Entschützung wesentlichen Wellenlängen durchlässig ist Wellenlängen, welche

nicht spezifisch zur Photoentschützung beitragen können durch diese Schichten oder andere Teile der Optik absorbiert werden. Besonders kurzwelliges ultraviolettes Licht wird durch diese Schichten absorbiert. Dieses zerstört DNA. Die eine Schicht Material wirkt dabei auch als Elektrode. Auf die andere Schicht werden in der Art Leitungen gelegt, daß die gesamte Matrix definiert durch Zellen, die einzeln elektrisch ansteuerbar sind in ein enges Gitter von Punkten unterteilt ist. Elektrische Anregung führt zu einer Ausrichtung der Flüssigkristalle nur an den definierten Punkten. Dort wird dann Licht absorbiert. Andererseits ist es aber auch möglich, das nur die angeregten Punkte für Licht einer bestimmten Wellenlänge durchlässig werden. Beide Varianten sollen also geschützt werden. Im Prinzip kann die Flüssigkristallmatrix genau die Größe der darunterliegenden Chip-Oberfläche haben. Dann muß Licht mit einem verhältnismäßig parallelen Strahlengang durch eine einfache Lichtquelle auf die Matrix gestrahlt werden. Die Flüssigkristallmatrix kann aber auch beliebig größer sein, als die bestrahlte Oberfläche. In diesem Fall muß zwischen Matrix und Chip eine Optik eingeführt werden, welche das durchscheinende Licht bündelt. Die Vorteile einer solchen Anordnung sind, daß die pro Fläche auf die Matrix einwirkende Energie geringer wird als auf der Chip-Oberfläche. Damit kann der problematische Effekt vermieden werden, welcher bei dauerhafter Bestrahlung die Absorptionfähigkeit der Flüssigkristalle schmälert. Außerdem kann die Zahl der einzelnen Punkte auf der Chip-Oberfläche praktisch beliebig gesteigert werden (Fig. 2).

Die letzte wesentliche Eigenschaft die beschriebenen Verfahrensweisen liegt in den Algorithmen, welche zur Ansteuerung der Flüssigkristallmatrix verwendet werden. Eine nach dem erfindungsgemäßen Verfahren ausgelegte Vorrichtung kann von der Eingabe einer oder vieler Sequenzen, welche durch Hybridisierung einer Ziel-DNA mit dem Chip getestet werden sollen, selbständig operieren. Die Datenverarbeitung kann aus den eingegebenen Sequenzen selbständig die zu synthetisierenden Oligonukleotide errechnen und die Abfolge der zu deren Synthese notwendigen Masken berechnen. Diese werden dann, koordiniert mit den verschiedenen chemischen Reaktionsschritten vollautomatisch während der Synthese durch das Muster der in den einzelnen Entschützungsschritten an die Matrix angelegten Spannungen umgesetzt.

Im Prinzip kann auch ein Detektor (zum Beispiel eine CCD Kamera) in die Vorrichtung eingebaut werden. Diese kann dann nach einer Hybridisierung Signale an den einzelnen Punkten der Chip-Oberfläche registrieren und auswerten.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist zum ersten Mal eine Methode geschaffen worden, welche ein billiges und schnelles Synthetisieren von DNA- oder PNA-Chips ermöglicht, deren Belegung mit Sequenzen vom eigentlichen Bediener individuell festgelegt werden kann. Unser Verfahren revolutioniert die Technologie der DNA-Chips von Grund auf.

#### Patentansprüche

Verfahren zur photolithographischen Herstellung von Oligonukleotiden auf zweidimensionalen Matrizen zur Produktion von sogenannten DNA-, PNA oder Protein-Chips, **dadurch gekennzeichnet**, daß als photolithografische Maske eine dynamisch ansteuerbare Flüssigkristallmaske verwendet wird.

- Leerseite -

Fig.1

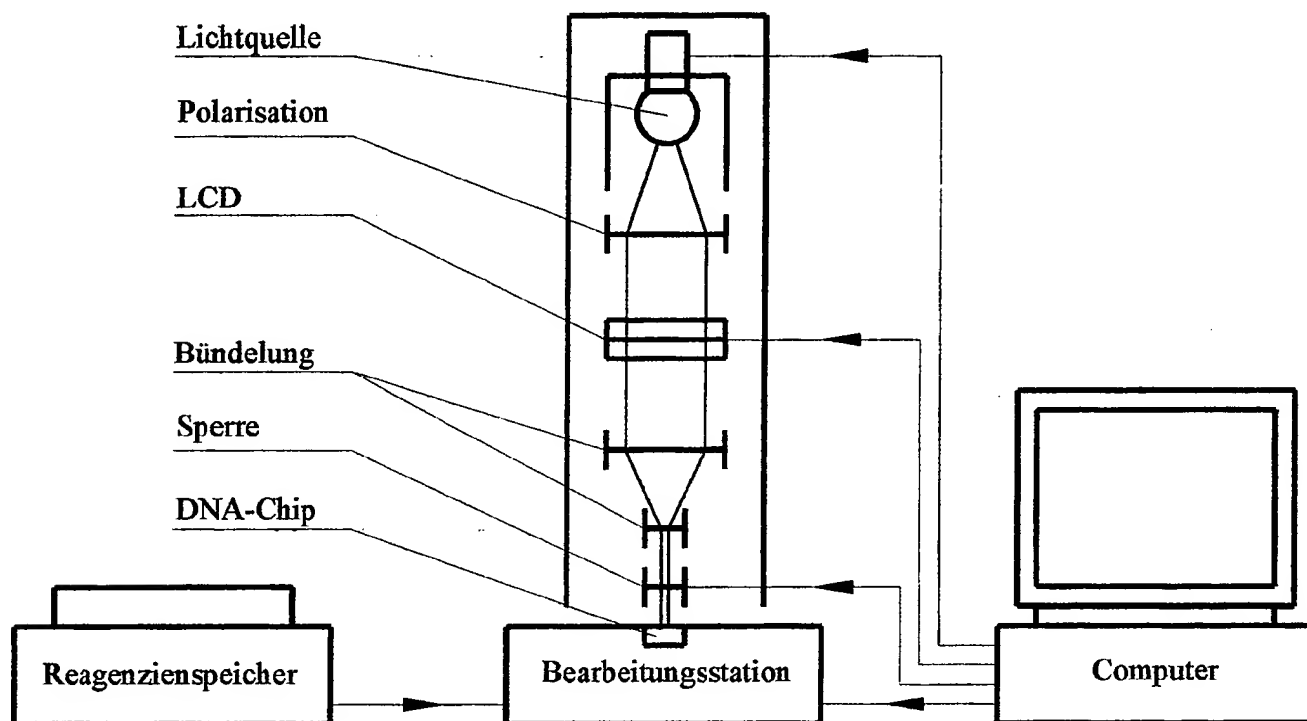
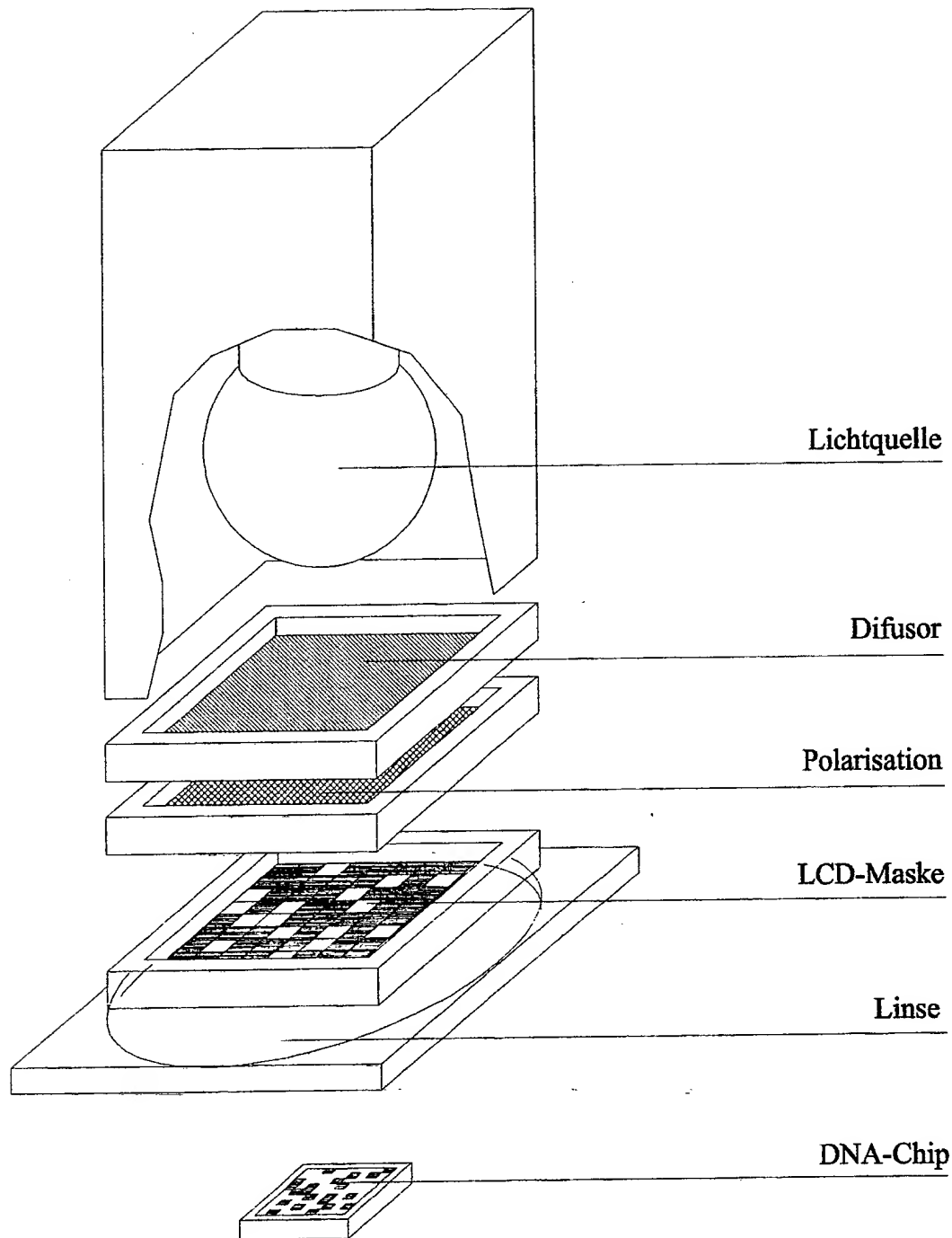


Fig.2





# Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis

(sequencing by hybridization/combinatorial chemistry/DNA diagnostics)

ANN CAVIANI PEASE<sup>†</sup>, DENNIS SOLAS<sup>†</sup>, EDWARD J. SULLIVAN<sup>†</sup>, MAUREEN T. CRONIN<sup>‡</sup>,  
CHRISTOPHER P. HOLMES<sup>†</sup>, AND STEPHEN P. A. FODOR<sup>†‡</sup>

<sup>†</sup>Affimetrix, 3380 Central Expressway, Santa Clara, CA 95051; and <sup>‡</sup>Affymax, 4001 Miranda Avenue, Palo Alto, CA 94304

Communicated by Ronald W. Davis, January 4, 1994

**ABSTRACT** In many areas of molecular biology there is a need to rapidly extract and analyze genetic information; however, current technologies for DNA sequence analysis are slow and labor intensive. We report here how modern photolithographic techniques can be used to facilitate sequence analysis by generating miniaturized arrays of densely packed oligonucleotide probes. These probe arrays, or DNA chips, can then be applied to parallel DNA hybridization analysis, directly yielding sequence information. In a preliminary experiment, a  $1.28 \times 1.28$  cm array of 256 different octanucleotides was produced in 16 chemical reaction cycles, requiring 4 hr to complete. The hybridization pattern of fluorescently labeled oligonucleotide targets was then detected by epifluorescence microscopy. The fluorescence signals from complementary probes were 5–35 times stronger than those with single or double base-pair hybridization mismatches, demonstrating specificity in the identification of complementary sequences. This method should prove to be a powerful tool for rapid investigations in human genetics and diagnostics, pathogen detection, and DNA molecular recognition.

Conventional DNA sequencing technology is a laborious procedure requiring electrophoretic size separation of labeled DNA fragments. An alternative approach to *de novo* DNA sequencing, termed sequencing by hybridization (SBH), has been proposed (1–3). This method uses a set of short oligonucleotide probes of defined sequence to search for complementary sequences on a longer target strand of DNA. The hybridization pattern is then used to reconstruct the target DNA sequence. It is envisioned that hybridization analysis of large numbers of probes can be used to sequence long stretches of DNA. In more immediate applications of hybridization methodology, a small number of probes can be used to interrogate local DNA structure.

The strategy of SBH can be illustrated by the following example. A 12-mer target DNA sequence, AGCCTAGCTGAA, is mixed with a complete set of octanucleotide probes. If only perfect hybridization complementarity is considered, 5 of the 65,536 octamer probes—TCGGATCG, CGGATCGA, GGATCGAC, GATCGACT, and ATCGACTT—will hybridize to the target. Alignment of the overlapping sequences from the hybridizing probes reconstructs the complement of the original 12-mer target:

```
TCGGATCG
CGGATCGA
GGATCGAC
GATCGACT
ATCGACTT
TCGGATCGACTT
```

Hybridization methodology can be carried out by attaching target DNA to a surface. The target is then interrogated with a set of oligonucleotide probes, one at a time (4, 5). This approach can be implemented with well-established methods of immobilization and hybridization detection but involves a large number of manipulations. For example, to probe a sequence utilizing a full set of octanucleotides, tens of thousands of hybridization reactions must be performed.

Alternatively, SBH can be carried out by attaching probes to a surface in an array format where the identity of the probe at each site is known. The target DNA is then added to the array of probes. The hybridization pattern determined in a single experiment directly reveals the identity of all complementary probes. The testing of this SBH format has required the development of new technologies for the fabrication of oligonucleotide arrays (6, 7). Most recently, an oligonucleotide array of 256 octanucleotides was generated using a solution-channeling device to direct the oligonucleotide probe synthesis into  $3 \times 3$  mm sites (7). In this format, the resolution limit of approximately  $1 \times 1$  mm may ultimately limit the number of probes that one can synthesize on a substrate of a manageable size (7).

We report here a method by which light is used to direct the synthesis of oligonucleotide probes in high-density, miniaturized arrays. Photolabile 5'-protected *N*-acyl-deoxynucleoside phosphoramidites, surface linker chemistry, and versatile combinatorial synthesis strategies have been developed for this technology. A matrix of 256 spatially defined oligonucleotide probes was generated, and the ability to use the array to identify complementary sequences was demonstrated by hybridizing fluorescently labeled octanucleotides. The hybridization pattern demonstrates a high degree of base specificity and reveals the sequence of oligonucleotide targets.

## MATERIALS AND METHODS

The basic strategy for light-directed oligonucleotide synthesis (6) is outlined in Fig. 1. The surface of a solid support modified with photolabile protecting groups (X) is illuminated through a photolithographic mask, yielding reactive hydroxyl groups in the illuminated regions. A 3'-*O*-phosphoramidite-activated deoxynucleoside (protected at the 5'-hydroxyl with a photolabile group) is then presented to the surface and coupling occurs at sites that were exposed to light. Following capping, and oxidation, the substrate is rinsed and the surface is illuminated through a second mask, to expose additional hydroxyl groups for coupling. A second 5'-protected, 3'-*O*-phosphoramidite-activated deoxynucleoside is presented to the surface. The selective photodeprotection and coupling cycles are repeated until the desired set of products is

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Abbreviations: SBH, sequencing by hybridization; MeNPoc,  $\alpha$ -methyl-6-nitropiperonyloxycarbonyl; DMT, 4,4'-dimethoxytrityl chloride.

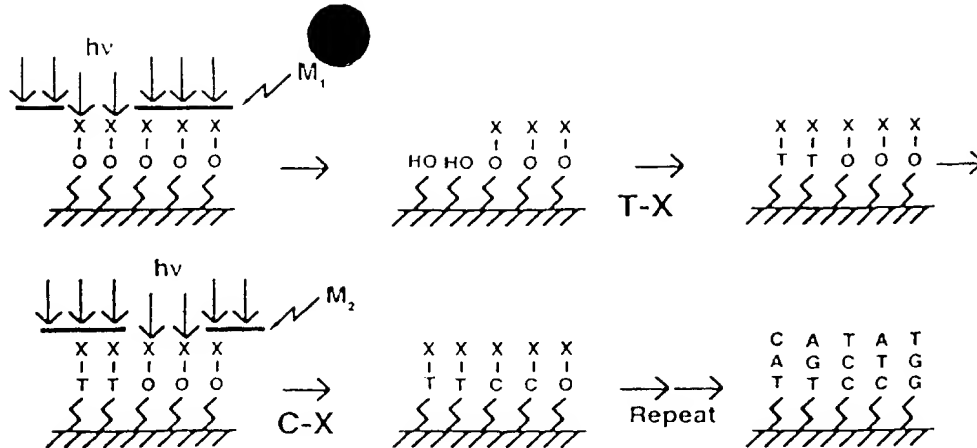


FIG. 1. Light-directed synthesis of oligonucleotides. A surface bearing photoprotected hydroxyls (X-O) is illuminated through a photolithographic mask ( $M_1$ ), generating free hydroxyl groups in the photodeprotected regions. The hydroxyl groups are then coupled to a deoxynucleoside phosphoramidite (5'-photoprotected). A new mask pattern ( $M_2$ ) is applied, and a second photoprotected phosphoramidite is coupled. Rounds of illumination and coupling are repeated until the desired set of products is obtained.

obtained. Since photolithography is used, the process can be miniaturized to generate high-density arrays of oligonucleotide probes. Furthermore, the sequence of the oligonucleotides at each site is known.

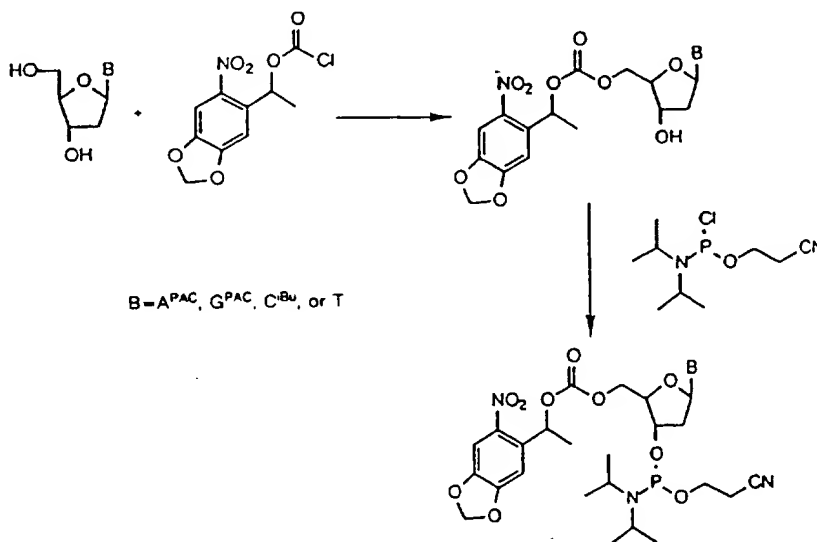
**5'-Photolabile *N*-Acyl-deoxynucleoside-3'-*O*-phosphoramidites.** Two factors enter into the design of photolabile 5'-hydroxyl protecting groups. Because the bases have strong  $\pi-\pi^*$  transitions in the 280-nm region, the deprotection wavelength should be longer than 280 nm to avoid undesirable nucleoside photochemistry. In addition, the photodeprotection rates of the four deoxynucleosides should be similar so that light will equally effect deprotection in different illuminated synthesis sites. To meet these criteria we have developed a set of 5'-*O*-( $\alpha$ -methyl-6-nitropiperonyloxycarbonyl)-*N*-acyl-2'-deoxynucleosides (MeNPoc-*N*-acyl-deoxynucleosides) and measured their photokinetic behavior.

The synthetic pathway for preparing 5'-*O*-( $\alpha$ -methyl-6-nitropiperonyloxycarbonyl)-*N*-acyl-2'-deoxynucleoside phosphoramidites (MeNPoc-*N*-acyl-2'-deoxynucleoside phosphoramidites) is illustrated in Scheme I. In the first step, an *N*-acyl-2'-deoxynucleoside reacts with 1-(2-nitro-4,5-methylenedioxyphenyl)ethyl-1-chloroformate to yield 5'-MeNPoc-*N*-acyl-2'-deoxynucleoside. In the second step, the 3'-hydroxyl reacts with 2-cyanoethyl *N,N'*-diisopropylchlorophosphoramidite using standard procedures to yield the 5'-MeNPoc-*N*-acyl-2'-deoxynucleoside-3'-*O*-(2-cyanoethyl-*N,N'*-diisopropyl)phosphoramidites. The photoprotecting group is stable under ordinary phosphoramidite synthesis con-

ditions and can be removed with aqueous base. These reagents can be stored for long periods under argon at 4°C.

A 0.1 mM solution of each of the four deoxynucleosides—MeNPoc-dT, MeNPoc-dC<sup>ibu</sup>, MeNPoc-dG<sup>PAC</sup>, and MeNPoc-dA<sup>PAC</sup>—was prepared in dioxane. Aliquots (200  $\mu$ l) were irradiated with 14.5 mW of 365-nm light per cm<sup>2</sup> in a narrow-path (2 mm) quartz cuvette for various times. Four or five time points were collected for each base, and the solutions were analyzed for loss of starting material at 280 nm on a Nucleosil 5-C<sub>8</sub> HPLC column using a mobile phase of 60% (vol/vol) in water containing 0.1% (vol/vol) trifluoroacetic acid [MeNPoc-dT required a mobile phase of 70% (vol/vol) methanol in water]. Peak areas of the residual MeNPoc-*N*-acyl-deoxynucleoside were calculated, yielding photolysis half-times of 28 s, 31 s, 27 s, and 18 s for MeNPoc-dT, MeNPoc-dC<sup>ibu</sup>, MeNPoc-dG<sup>PAC</sup>, and MeNPoc-dA<sup>PAC</sup>, respectively. In all subsequent lithographic experiments, illumination times of 4.5 min ( $9 \times t_{1/2}$ , MeNPoc-dC) were used to ensure >99% removal of MeNPoc protecting groups.

The synthesis support consists of a  $5.1 \times 7.6$  cm glass substrate prepared by cleaning in concentrated NaOH, followed by exhaustive rinsing in water. The surfaces were then derivatized for 2 hr with a solution of 10% (vol/vol) bis(2-hydroxyethyl)aminopropyltriethoxysilane (Petrarch Chemicals, Bristol, PA) in 95% ethanol, rinsed thoroughly with ethanol and ether, dried *in vacuo* at 40°C, and heated at 100°C for 15 min. In these studies, a synthesis linker is attached by reacting derivatized substrates with 4,4'-dimethoxytrityl (DMT)-hexaethyloxy-*O*-cyanoethyl phosphoramidite.



Scheme I

In a light-directed synthesis, the overall synthesis yield depends on the photodeprotection yield, the photodeprotection contrast, and the chemical coupling efficiency. Photokinetic conditions are chosen to ensure that photodeprotection yields are >99%. Unwanted photolysis in normally dark regions of the substrate can adversely affect the synthesis fidelity and can be minimized by using lithographic masks with a high optical density (5 OD units) and by careful index matching of the optical surfaces.

Two different methods were developed to investigate the chemical coupling efficiencies of the photoprotected nucleosides. First, the efficiencies were measured on hexaethylene glycol derivatized control pore glass. The glycol linker was detritylated and a MeNPoc-deoxynucleoside-*O*-cyanoethyl phosphoramidite coupled to the resin. Next, a DMT-deoxynucleoside-cyanoethyl phosphoramidite (reporter amidite) was added. The reporter amidite should couple to any unreacted hydroxyl groups remaining from the first coupling reaction. Following DMT deprotection, the trityl effluents were collected and quantified by absorption spectroscopy. In this assay, the coupling efficiencies are measured assuming a high coupling efficiency of the reporter amidite. The efficiencies of the MeNPoc-deoxyribonucleoside-*O*-cyanoethyl phosphoramidites to the hexaethylene glycol linker and the 16 different dinucleotide efficiencies were measured. The values ranged between 95% and 100% in this assay and were indistinguishable from values obtained with standard DMT-deoxynucleoside phosphoramidites.

To measure the coupling efficiency of the photoprotected nucleosides directly on the glass synthesis supports, each of the four MeNPoc-amidites was coupled to a substrate. A section of the substrate was deprotected by illumination and allowed to react against a MeNPoc-phosphoramidite. A new region of the substrate was then illuminated, a fluorescent deoxynucleoside phosphoramidite (FAM-phosphoramidite; Applied Biosystems) was coupled, and the substrate was scanned for fluorescence signal. Assuming that the fluorescently labeled phosphoramidite reacts at both the newly exposed hydroxyl groups and the previously unreacted hydroxyl groups, then the ratio of fluorescence intensities between the two sites provides a measure of the coupling efficiency. This measurement of the surface chemical coupling yields efficiencies ranging between 85% and 98%.

## RESULTS

**Spatially Directed Synthesis of an Oligonucleotide Probe.** To initiate the synthesis of an oligonucleotide probe, MeNPoc-dC<sup>ibu</sup>-3'-*O*-phosphoramidite was attached to a synthesis support through a linker (hexaethyloxy-*O*-cyanoethyl phosphoramidite). Regions of the support were activated for synthesis by illumination through 800 × 12800 μm apertures of a photolithographic mask. Seven additional phosphoramidite synthesis cycles were performed (with DMT-protected deoxynucleosides) to generate the sequence 3'-CGCATCCG. Following removal of the phosphate and exocyclic amine protecting groups with concentrated NH<sub>4</sub>OH for 4 hr, the substrate was mounted in a water-jacketed thermostatically controlled hybridization chamber.

**Hybridization of Targets to Surface Oligonucleotides.** To explore the availability of the support-bound octanucleotide probes for hybridization, 10 nM 5'-GCGTAGGC-fluorescein was introduced into the hybridization chamber and allowed to incubate for 15 min at 15°C. The surface was then interrogated with an epifluorescence microscope (488-nm argon ion excitation). The fluorescence image of this scan is shown in Fig. 2. The fluorescence intensity coincides with the 800 × 12800 μm stripe used to direct the synthesis of the probe. Furthermore, the signal intensities are high (four times over

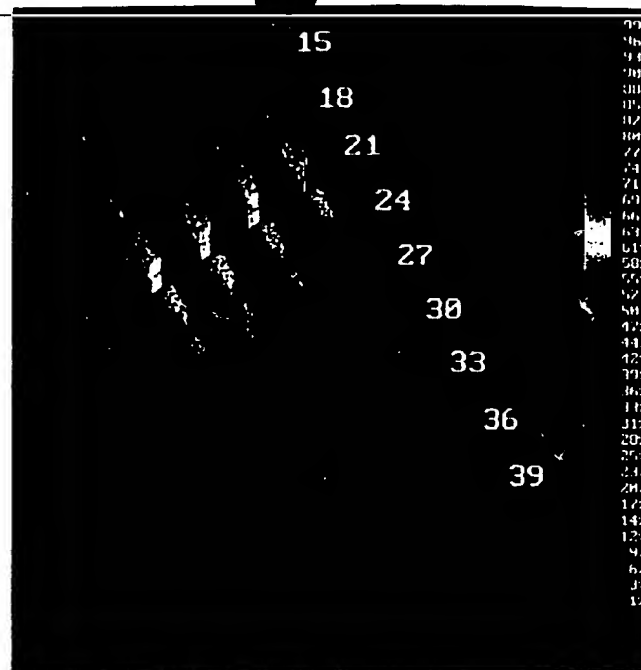


Fig. 2. Hybridization and thermal dissociation of oligonucleotides. Fluorescence scan of 5'-GCGTAGGC-fluorescein hybridized to complementary probes. The substrate surface was scanned with a Zeiss Axioscop 20 microscope using 488-nm argon ion laser excitation. The fluorescence emission above 520 nm was detected using a cooled photomultiplier (Hamamatsu 934-02) operated in photon-counting mode. The signal intensity is indicated on the color scale shown to the right of the image. The temperature is indicated to the right of each panel in °C.

the background of the glass substrate), demonstrating specific binding of the target to the probe.

The melting behavior of the target-probe complex was investigated by increasing the temperature in the hybridization chamber. After 10 min of incubation at each temperature, no significant changes in the fluorescence were observed, and the fluorescence intensities were recorded. The duplex melted in the temperature range expected for the sequence under study. The probes were stable to temperature denaturation of the target-probe complex as demonstrated by rehybridization of target DNA.

**Sequence Specificity of Target Hybridization.** To demonstrate the sequence specificity of probe hybridization, two different sequences were synthesized in 800 × 12800 μm stripes. Fig. 3A identifies the location of the two probes. The probe 3'-CGCATCCG was synthesized in stripes 1, 3, and 5. The probe 3'-CGCTTCCG was synthesized in stripes 2, 4, and 6. Fig. 3B shows the results of hybridizing 5'-GCGTAGGC-fluorescein to the substrate at 15°C. Although the probes differ by only one internal base, the target hybridizes specifically to its complementary sequence (≈500 counts above background in stripes 1, 3, and 5) with little or no detectable signal in positions 2, 4, and 6 (≈10 counts). Fig. 3C shows the results of hybridization with targets to both sequences. The signal in all positions in Fig. 3C illustrates that the absence of signal in Fig. 3B is due solely to the instability of the single base hybridization mismatch. Although the targets are present in equimolar concentrations, the ratios of signals in stripes 2, 4, and 6 in Fig. 3B are approximately 1.6 times higher than the ratios of signals in regions 1, 3, and 5, presumably due to slight differences in melting temperature values for the two duplexes. The duplexes were dissociated by raising the temperature to 45°C for 15 min, and the hybridizations were repeated in the reverse

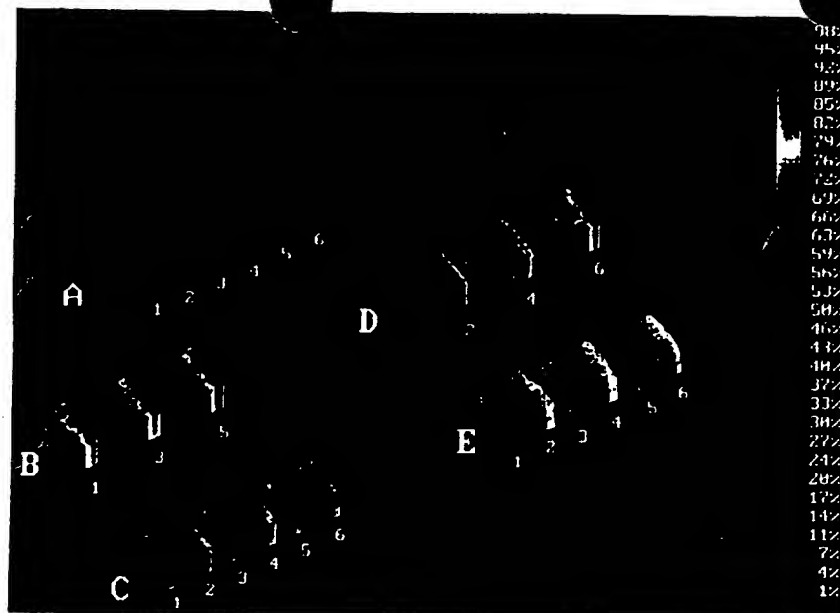


FIG. 3. Sequence specificity of hybridization. (A) Index of the probe composition at each synthesis site. 3'-CGCATCCG was synthesized in stripes 1, 3, and 5, and 3'-CGCTCCG was synthesized in stripes 2, 4, 6. (B) Fluorescence image showing hybridization of substrate with 10 nM 5'-GCGTAGGC-fluorescein. Hybridization was performed in 6× SSPE (1 M NaCl/66 mM sodium phosphate/6 mM EDTA, pH 7.4)/0.1% Triton X-100 at 15°C for 15 min. (C) Hybridization with 10 nM 3'-GCGAAGGC added to the hybridization solution of B. (D) After high-temperature dissociation of fluoresceinated targets from C, the substrate was incubated with 10 nM 3'-GCGAAGGC at 15°C for 15 min. (E) Hybridization with 10 nM 3'-GCGTAGGC added to the hybridization solution of D.

order (Fig. 3 D and E), demonstrating specificity of hybridization in the reverse direction.

**Combinatorial Synthesis of a Probe Matrix.** In a light-directed synthesis, the location and composition of products depend on the pattern of illumination and the order of chemical coupling reagents (6). Consider the synthesis of 256 tetranucleotides, as illustrated in Fig. 4. Mask 1 activates one-fourth of the substrate surface for coupling with the first of 4 nucleosides in the first round of synthesis. In cycle 2, mask 2 activates a different quarter of the substrate for coupling with the second nucleoside. The process is continued to build four regions of mononucleotides. The masks of round 2 are perpendicular to those of round 1, and each cycle generates four new dinucleotides. The process continues through round 2 to form 16 dinucleotides as illustrated in Fig. 4. The masks of round 3 further subdivide the synthesis regions so that each coupling cycle generates 16 trimers. The subdivision of the substrate is continued through round 4 to form the tetranucleotides. The synthesis of this probe matrix can be compactly represented in polynomial notation (6) as  $(A + C + G + T)^4$ . Expansion of this reaction polynomial identifies the 256 tetranucleotides.

The potential of light-directed combinatorial synthesis can be appreciated by the combinatorial synthesis of the probe matrix shown in Fig. 5A. The polynomial for this synthesis is given by  $3'-CG(A + G + C + T)^4CG$ . The synthesis map is given in Fig. 5B. All possible tetranucleotides are synthesized flanked by CG at the 3' and 5' ends. Hybridization of the target 5'-GCGGCGGC-fluorescein to this array at 15°C yields

the 3'-CGCCGCCG complementary probe as the most intense position (2698 counts). Significant intensity is also observed for the following mismatches: 3'-CGCAGCCG (554 counts), 3'-CGCCGACG (317 counts), 3'-CGCCGTCG (272 counts), 3'-CGACGCCG (242 counts), 3'-CGTCGCCG (203 counts), 3'-CGCCCCCG (180 counts), 3'-CGCTGCCG (163 counts), 3'-CGCCACCG (125 counts), and 3'-CGCCTCCG (78 counts).

## DISCUSSION

Arrays of oligonucleotides can be efficiently generated by light-directed synthesis and can be used to determine the identity of DNA target sequences. As shown here, an array of all tetranucleotides was produced in 16 cycles requiring 4 hr to complete. Because combinatorial strategies are used (6), the number of compounds increases exponentially while the number of chemical coupling cycles increases only linearly. For example, expanding the synthesis to the complete set of  $4^8$  (65,536) octanucleotides will add only 4 hr to the synthesis for the 16 additional cycles. Furthermore, combinatorial synthesis strategies can be implemented to generate arrays of any desired composition (6). For example, since the entire set of dodecamers ( $4^{12}$ ) can be produced in 48 photolysis and coupling cycles ( $b^n$  compounds requires  $b \times n$  cycles), any subset of the dodecamers (including any subset of shorter oligonucleotides) can be constructed with the correct lithographic mask design (6) in 48 or fewer chemical coupling steps. The number of compounds in an array is limited only

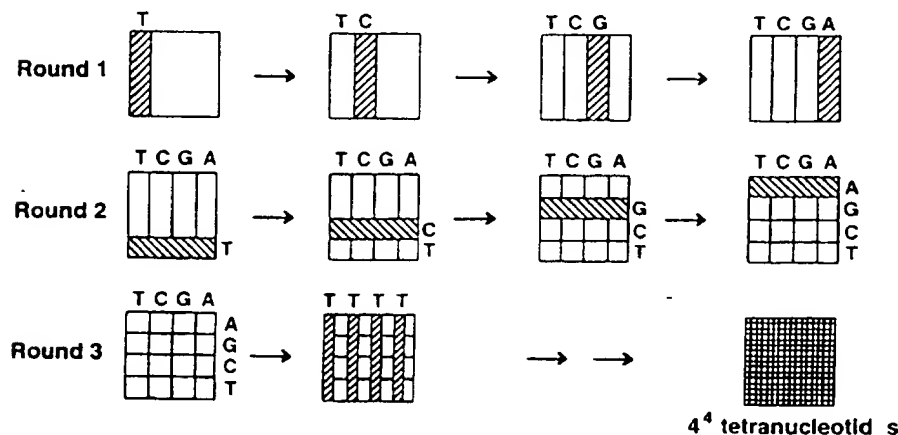


FIG. 4. Combinatorial synthesis of  $4^4$  tetranucleotides. In round 1, one-fourth of the synthesis area is activated by illumination through mask 1 for coupling of the first MeNPoc-nucleoside (A in this case). In cycle 2 of round 1, mask 2 activates a different one-quarter section of the synthesis substrate and a different nucleoside (T) is coupled. Further lithographic subdivisions of the array and chemical couplings generate the complete set of 256 tetranucleotides as described in the text.

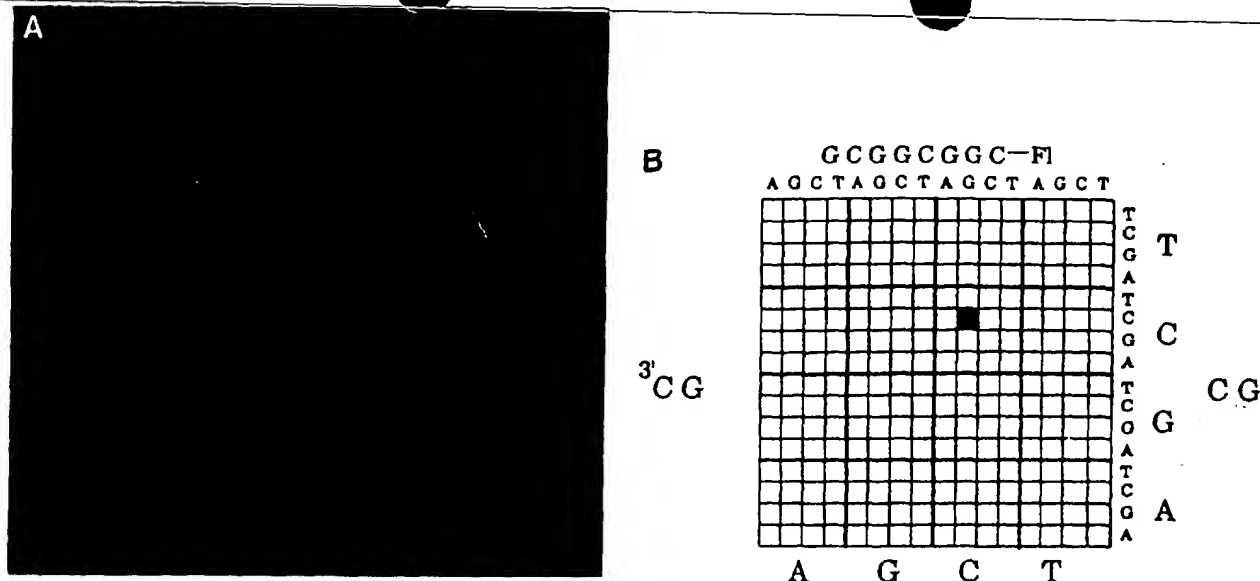


FIG. 5. Hybridization to a matrix of 256 octanucleotides. (A) Fluorescence image of a 256-octanucleotide array following hybridization with 10 nM 5'-GCGGCGGC-fluorescein in 6× SSPE/0.1% Triton X-100 for 15 min at 15°C. (B) Matrix decoder for the array. The matrix synthesis is represented by the polynomial  $3'\text{-CG}(\text{A} + \text{G} + \text{C} + \text{T})^4\text{CG}$ . The site containing the complementary sequence 3'-CGCGCCCG is highlighted for reference.

by the density of synthesis sites and the overall array size. Recent experiments have demonstrated hybridization to probes synthesized in 25- $\mu\text{m}$  sites. At this resolution, the entire set of 65,536 octanucleotides can be placed in an array measuring 0.64-cm square, and the set of 1,048,576 dodecanucleotides requires only a 2.56-cm array.

Genome sequencing projects will ultimately be limited by DNA sequencing technologies. Current sequencing methodologies are highly reliant on complex procedures and require substantial manual effort (8, 9). SBH has the potential for transforming many of the manual efforts into more efficient and automated formats. Light-directed synthesis is an efficient means for enabling SBH and for the large-scale production of miniaturized arrays.

Oligonucleotide arrays are not limited to primary sequencing applications. Because single base changes cause multiple changes in the hybridization pattern, the oligonucleotide arrays will provide a powerful means to check the accuracy of previously elucidated DNA sequence or to scan for changes within a sequence. In the case of octanucleotides, a single base change in the target DNA results in the loss of eight complements and generates eight new complements. Matching of hybridization patterns may be useful in resolving sequencing ambiguities from standard gel techniques or for rapidly detecting DNA mutational events.

The potentially very high information content of light-directed oligonucleotide arrays will change genetic diagnostic testing. Sequence comparisons of hundreds to thousands of different genes will be assayed simultaneously instead of the current one, or few at a time format. Custom arrays can also be constructed to contain genetic markers for the rapid identification of a wide variety of pathogenic organisms.

Oligonucleotide arrays can also be applied to study the sequence specificity of RNA- or protein-DNA interactions. Experiments can be designed to elucidate specificity rules of non-Watson-Crick oligonucleotide structures or to investigate the use of novel synthetic nucleoside analogs for antisense or triple helix applications. Suitably protected RNA monomers may be employed for RNA synthesis. The oligonucleotide arrays should find broad application deducing the thermodynamic and kinetic rules governing formation and stability of oligonucleotide complexes.

We are grateful to L. Stryer, P. Schultz, and F. Pease for their critical reading and helpful comments on the manuscript. A.C.P. is a National Institutes of Health postdoctoral fellow (HG 00060). This work was sponsored in part by National Institutes of Health (HG 00813) and Department of Energy (DE FG03 92ER) grants to S.P.A.F.

1. Lysov, Yu. P., Florentiev, V. L., Khorlyn, A. A., Khrapko, K. R., Shick, V. V. & Mirzabekov, A. D. (1988) *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 303, 1508-1511.
2. Bains, W. & Smith, G. C. (1988) *J. Theor. Biol.* 135, 303-307.
3. Drmanac, R., Labat, I., Brukner, I. & Crkvenjakov, R. (1989) *Genomics* 4, 114-128.
4. Strezoska, Z., Paunesku, T., Radosavljevic, D., Labat, I., Drmanac, R. & Crkvenjakov, R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10089-10093.
5. Drmanac, R., Drmanac, S., Strezoska, Z., Paunesku, T., Labat, I., Zeremski, M., Snoddy, J., Funckhouser, W. K., Koop, P., Hood, L. & Crkvenjakov, R. (1993) *Science* 260, 1649-1652.
6. Fodor, S. P. A., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Tsai Lu, A. & Solas, D. (1991) *Science* 251, 767-773.
7. Southern, E. M., Maskos, U. & Elder, J. K. (1992) *Genomics* 13, 1008-1017.
8. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
9. Maxam, A. M. & Gilbert, W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 560-564.

